



TITLE:

強心配糖体ジゴキシンの腎排泄機構に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

岡村, 昇

CITATION:

岡村, 昇. 強心配糖体ジゴキシンの腎排泄機構に関する研究. 京都大学, 1993, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

1993-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3066223>

RIGHT:

強心配糖体ジゴキシンの
腎排泄機構に関する研究

1993

岡 村 昇

目 次

総論の部	1
緒言	1
第1章 摘出灌流腎によるジゴキシシン腎排泄機構の解析	2
第1節 摘出灌流腎におけるジゴキシシン腎排泄挙動	3
第2節 抗不整脈剤キニジン、ペラパミルとの相互作用	11
第3節 P-糖蛋白質関連薬剤との相互作用	18
第2章 経細胞輸送評価系の確立とジゴキシシン輸送機構の解明	21
第1節 MDR1 cDNAの培養腎上皮細胞LLC-PK ₁ への導入	23
第2節 P-糖蛋白質を介するステロイドホルモンの輸送	31
第3節 経細胞輸送評価系によるジゴキシシン輸送	36
第4節 細胞からのジゴキシシン排出	39
第5節 ジゴキシシン体内動態におけるP-糖蛋白質の関与	42
第3章 ジゴキシシン腎排泄における相互作用予測システムの確立	44
第1節 ジゴキシシン-スピロノラクトン相互作用機構	45
第2節 ジゴキシシン-シクロスポリンA相互作用機構	55
結論	62
謝辞	65
実験の部	66
引用文献	78

総論の部

緒言

強心配糖体ジゴキシンは、うっ血性心不全や心房細動等の治療薬として、古くから臨床的に繁用されている。その作用機構は、心筋の Na^+, K^+ -ATPase を阻害し、細胞内 Na^+ 濃度の上昇、ひいては Ca^{2+} の流入を促進し、心筋力を増大させることにある(1)。しかしその治療域は 0.8-2.0 ng/ml と狭く、中毒域では房室間伝導抑制に基づく不整脈等の重篤な副作用を引き起こすこと、また体内動態の個体内、個体間変動が大きいことから薬物血中濃度モニタリングに基づく投与設計の必要な代表的薬物である(1-3)。その主たる消失経路は腎排泄で、糸球体濾過、尿細管分泌、再吸収の寄与が知られているが(2,4-6)、その詳細な機構は全く不明であった。また、キニジン、ベラパミル、スピロノラクトン等併用時にジゴキシンの腎排泄が低下し、血中濃度が上昇することが報告されており、臨床上問題となっているが、その相互作用機構も全く不明であった(7,8)。これらの機構解明はジゴキシンの個体内、個体間変動を予測し、有効かつ安全な投与設計を行なう上で、重要な課題といえる。そこで著者は、ジゴキシンの腎排泄機構並びに相互作用機構について生物薬剤学的手法、分子生物学的手法を応用し、それらの解明を試みた結果、癌細胞の多剤耐性に関わる輸送系 P-糖蛋白質を介した機構を明らかにすることができた。以下、これらについて 3 章にわたり論述する。

第1章 摘出灌流腎によるジゴキシン腎排泄機構の解析

ジゴキシン(Fig. 1)の主たる消失経路は腎排泄であることは、古くから尿中に未変化体で70-80%排泄されることから明らかであった(2)。

Steinessが1974年に初めて、ジゴキシンが尿細管分泌、再吸収を受けることを明らかにして以来(4)、その機構解明を目的として、多くの研究がなされてきた。分泌については、何らかの輸送システムが存在していることが示唆されているが、これまでその実体は明らかにされていなかった(7)。そこで著者はその機構解明を目的として、摘出灌流腎を用いジゴキシン分泌を検討した。本実験法は当研究室で開発され、他臓器の影響を除去し腎にのみ焦点を当てて薬物の腎排泄挙動を検討できる、灌流液組成を自由に設定できる、臓器レベルでの薬物腎挙動を詳細に解析することができる、さらに尿細管分泌における血液から細胞内への移行過程と細胞内から管腔への移行過程を分離して評価できる等の利点を有しており、すでに有機カチオン、有機アニオン性薬物の腎挙動を解析する上で有用であることが示されている(9-12)。本章では、摘出灌流腎を用い、臓器レベルにおけるジゴキシン腎排泄挙動、薬物相互作用機構の解明を試みた。

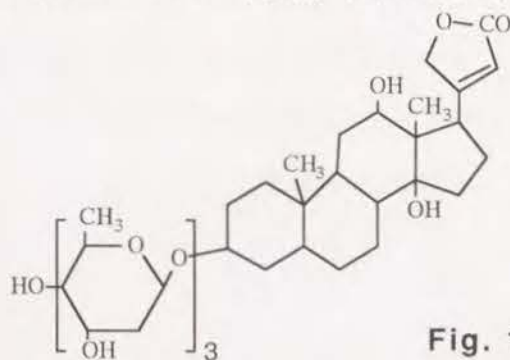


Fig. 1.
Structure of Digoxin.

第1節 摘出灌流腎におけるジゴキシン腎排泄挙動

既報に従い(9-12)、Wistar系雄性ラット右腎動脈、静脈、尿管にカニューレーションを施し、16-19%牛赤血球、5%BSAを含むKrebs-Henseleit bicarbonate buffer(KHBB)で、血圧・血流を一定に維持して灌流した(Fig. 2)。血管内容積マーカーとしてエバンスブルー標識アルブミン、細胞外液及び糸球体濾過マーカーとして $[^{14}\text{C}]$ 標識したイヌリンを用い、 $[^3\text{H}]$ 標識したジゴキシンと共に腎動脈内から急速投与し、経時的に静脈流出液、尿を採取した。得られた希釈曲線を比較することによりジゴキシン腎排泄挙動を解析した。

Table 1には本実験における腎機能の指標として、血漿流量、尿量、糸球体濾過速度及び Na^+ 、グルコースの再吸収率を示した。ウアベイン共存下で尿量の増加、並びに Na^+ 、グルコースの再吸収の低下が観察された。ウアベインは、 Na^+ , K^+ -ATPaseを阻害する(1)ことにより、 Na^+ 勾配の低下による再吸収の低下、 Na^+ 勾配により駆動されるグルコースの再吸収の低下、また管腔中 Na^+ 濃度増加による水の再吸収低下、それによる尿量の増加を引き起こしたものと考えられた。また、テトラエチルアンモニウム(TEA)存在下で Na^+ 、グルコース再吸収低下が観察され、若干の毒性が出たものと思われる。他の阻害剤存在下では、これらの値に変化がなく、正常な腎機能を維持していると考えられる。

Fig. 3には摘出灌流腎から得られる典型的な希釈曲線を示した。静脈側では、アルブミン、イヌリン、ジゴキシンのそれぞれの腎組織移行性に応じた特徴的なパターンが観察できた。即ち、血管外には分布しないアルブミンは、速く高いピークを、細胞外液まで分布するイヌリンは、や

Table 1**Experimental Conditions of the Isolated Perfused Rat Kidney.**Values are means \pm S.D. Numbers in parentheses represent the number of experiments.

	PFR ^a (ml/min)	UFR ^b (ml/min)	GFR ^c (ml/min)	FR _{Na⁺} ^d (%)	FRGlc ^e (%)
Control (7)	5.18 \pm 0.63	0.093 \pm 0.039	0.409 \pm 0.084	94.8 \pm 3.2	96.9 \pm 1.0
Steady-state condition					
Quinidine 0.8 μ M (3)	5.13 \pm 0.25	0.138 \pm 0.138	0.498 \pm 0.324	84.5 \pm 13.3	97.4 \pm 0.5
Quinidine 8 μ M (3)	4.93 \pm 0.62	0.115 \pm 0.071	0.379 \pm 0.133	91.3 \pm 4.7	96.1 \pm 0.6
Verapamil 0.8 μ M (3)	5.15 \pm 0.23	0.094 \pm 0.029	0.380 \pm 0.066	92.6 \pm 6.3	95.7 \pm 3.9
Verapamil 8 μ M (3)	5.10 \pm 0.27	0.082 \pm 0.050	0.378 \pm 0.133	95.6 \pm 1.2	95.4 \pm 2.3
TEA 300 μ M (3)	5.25 \pm 0.52	0.095 \pm 0.025	0.322 \pm 0.167	87.2 \pm 5.5*	93.3 \pm 1.6**
PAH 300 μ M (3)	5.42 \pm 0.22	0.083 \pm 0.025	0.339 \pm 0.136	90.3 \pm 2.9	97.4 \pm 0.4
Ouabain 300 μ M (3)	5.24 \pm 0.62	0.209 \pm 0.068**	0.461 \pm 0.104	61.3 \pm 7.6***	93.3 \pm 0.5***
Digitoxose 300 μ M (3)	4.90 \pm 0.36	0.104 \pm 0.012	0.411 \pm 0.100	95.2 \pm 2.4	97.7 \pm 3.1
DNP 1mM (3)	5.42 \pm 0.48	0.072 \pm 0.029	0.366 \pm 0.049	95.9 \pm 2.3	98.5 \pm 0.4
Vinblastine 8 μ M (3)	5.25 \pm 0.31	0.165 \pm 0.141	0.431 \pm 0.258	86.2 \pm 13.2	96.5 \pm 2.3
Vinblastine 20 μ M (3)	4.86 \pm 0.02	0.106 \pm 0.048	0.490 \pm 0.234	93.7 \pm 2.6	97.1 \pm 4.1
Daunorubicin 20 μ M (4)	5.41 \pm 0.76	0.108 \pm 0.030	0.537 \pm 0.125	96.4 \pm 1.4	98.3 \pm 0.8
Reserpine 8 μ M (3)	5.96 \pm 0.50	0.103 \pm 0.032	0.516 \pm 0.216	95.8 \pm 1.6	97.3 \pm 2.6

Table 1**Continued.**

	PFR ^a (ml/min)	UFR ^b (ml/min)	GFR ^c (ml/min)	FR _{Na⁺} ^d (%)	FRGlc ^e (%)
Bolus condition					
Quinidine 80 μ M (3)	4.78 \pm 0.39	0.112 \pm 0.035	0.461 \pm 0.066	91.7 \pm 5.0	98.4 \pm 0.4
Verapamil 80 μ M (3)	5.11 \pm 0.14	0.110 \pm 0.022	0.501 \pm 0.100	93.4 \pm 1.0	96.6 \pm 1.5
Vinblastine 200 μ M (3)	4.72 \pm 0.35	0.079 \pm 0.008	0.381 \pm 0.104	95.7 \pm 1.5	96.8 \pm 1.1

^a Plasma flow rate.^b Urine flow rate.^c Glomerular filtration rate.^d Fractional reabsorption of Na⁺.^e Fractional reabsorption of glucose.

*Significantly different from control, P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

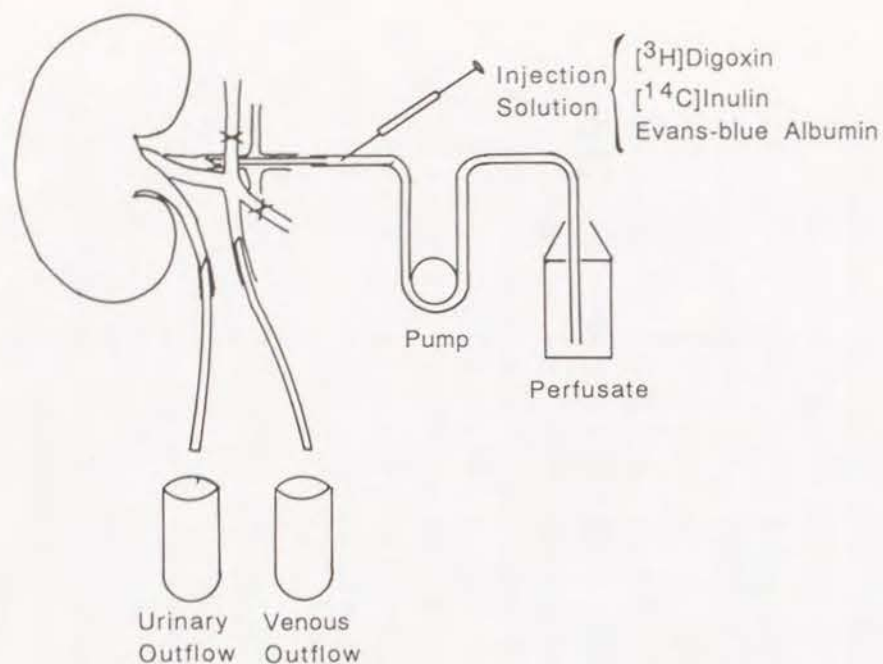


Fig. 2.
Scheme of the Isolated Perfused Rat Kidney System.

や遅く、低いピークを示した。尿細管上皮細胞内にまで分布するジゴキシンは、さらに遅く、低いピークを示し、その分布が大きいことを示唆した。この結果は、ジゴキシンの分布容積が非常に大きいことと一致する(5,6,13)。尿から得られるパターンでは、イヌリンの排泄量より、ジゴキシンの排泄量が上回り、ヒトと同様、尿細管分泌の寄与が示された。従って、ラットを用いた摘出腎灌流法はジゴキシン分泌機構を解析する上で有用であると考えられた。

次に、その分泌機構を明らかにする目的で、種々の化合物のジゴキシン分泌に対する影響を検討した。即ち、化合物を一定濃度添加した灌流液をジゴキシン投与前から灌流させておく定常状態(Steady-state

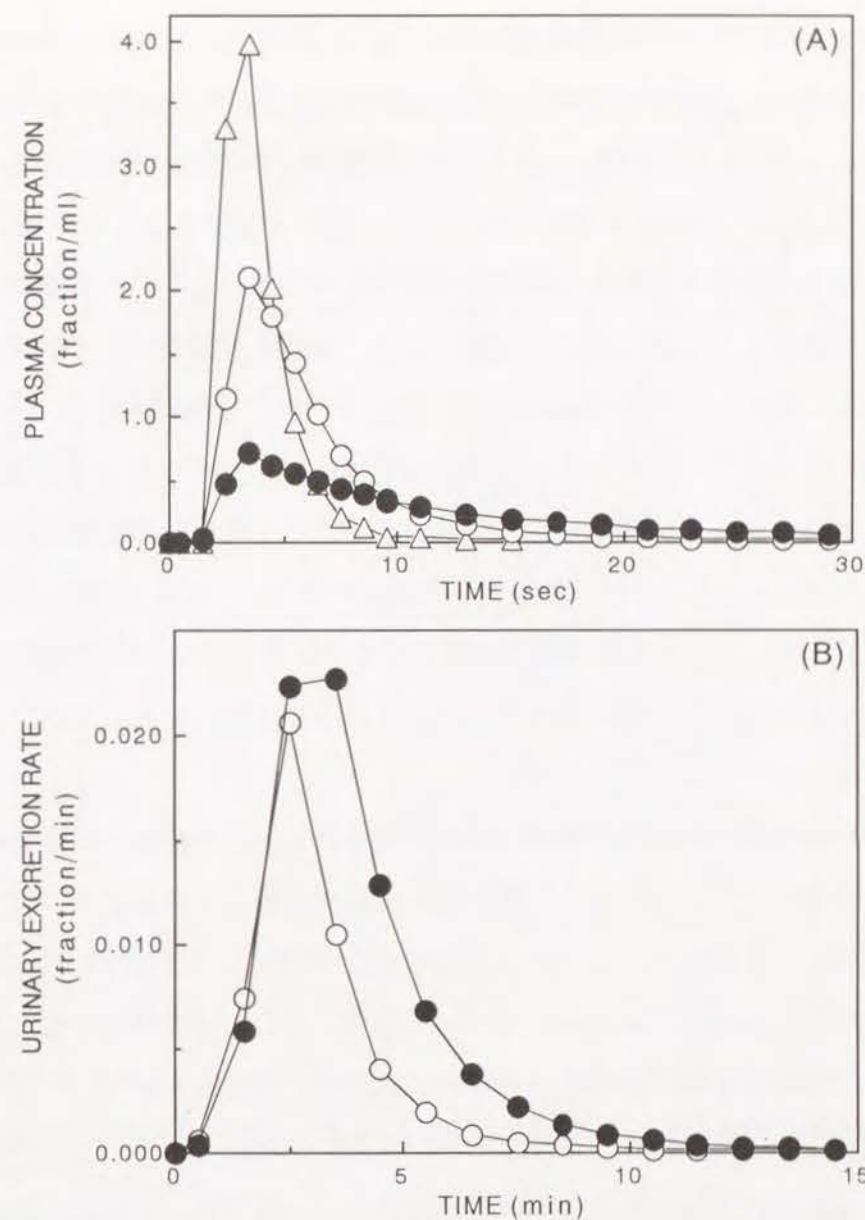


Fig. 3.
Typical Venous (A) and Urinary (B) Outflow Curves of Albumin (Δ), Inulin (\circ) and Digoxin (\bullet) in the Isolated Perfused Rat Kidney.

condition)実験で、その影響を調べた。Fig. 4の縦軸は、イヌリンの排泄量とジゴキシンの蛋白結合率(20%)から見積ったジゴキシンの糸球体濾過率(Filtration fraction; FF)に対する尿中排泄率(Fractional Excretion; FE)の比(EF/FF)で、分泌量の指標とした。この比が1を越えると分泌が再吸収を上回ることを意味する。腎臓における薬物輸送系として、有機カチオン、有機アニオン輸送系が知られており、当研究室並びに他の研究者達が数多く報告している(9-12,14-18)。そこでこれらの輸送系がジゴキシンの分泌に関与しているかについて、それぞれの輸送系の典型的な基質であるテトラエチルアンモニウム(TEA)、パラアミノ馬尿酸(PAH)を過剰量存在下検討したが、Fig. 4に示すようにジゴキシンの分泌には変化がなかった。従って、非イオン性薬物であるジゴキシンの分泌は有機カチオン、有機アニオン輸送系とは異なる輸送機構であることが示され、以前の報告(19,20)と一致した。

肝臓では強心配糖体特有の輸送系が示唆されているが(21)、腎臓では強心配糖体ウアベインによる阻害が認められず肝臓とは異なるメカニズムと推察される(Fig. 4)。また、この結果は、ジゴキシンの作用部位である Na^+, K^+ -ATPaseはジゴキシンの分泌に関与しないことを意味する。ジゴキシンの腎排泄を低下させるキニジン、スピロノラクトンが Na^+, K^+ -ATPaseを阻害しうることからO'Brianらは Na^+, K^+ -ATPaseへの結合がジゴキシンの分泌に関与していると推察している(22)。しかし、Itoらは培養腎上皮細胞LLC-PK₁細胞を用い、 Na^+, K^+ -ATPaseのジゴキシンの分泌における関与について検討し(23)、ジゴキシンの細胞への結合をウアベインは阻害するが、経細胞輸送には影響がないことから、分泌に Na^+, K^+ -ATPaseが関与していないと結論付けている。摘出灌流腎により、

ウアベイン0.3 mM共存下、 Na^+, K^+ -ATPaseが阻害されていると考えられる条件下、ジゴキシンの分泌に影響がないことが観察できたことより、 Na^+, K^+ -ATPaseはジゴキシンの分泌に関与していないことが臓器レベルで明らかとなった。

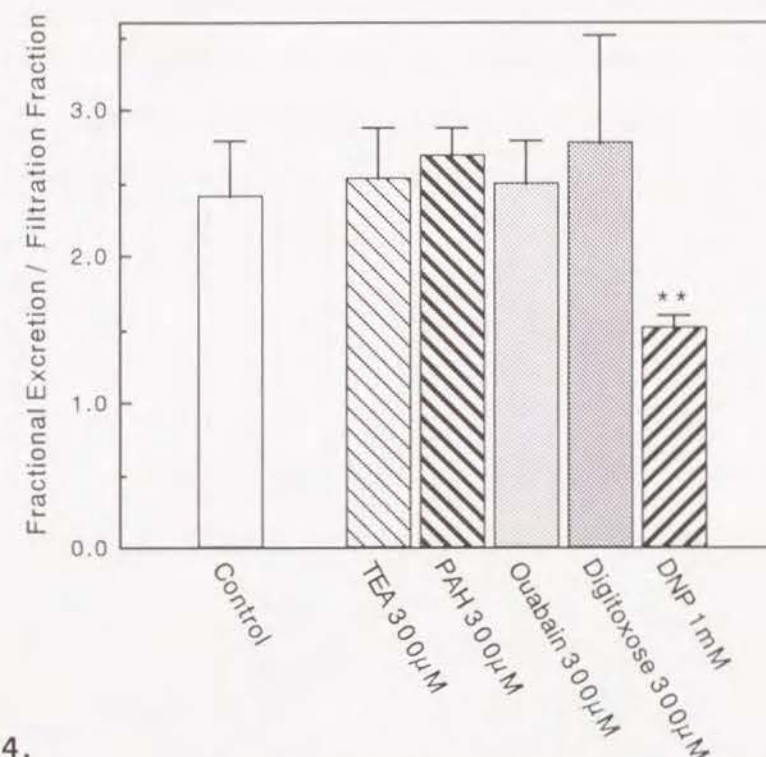


Fig. 4.
Effect of Several Compounds on Renal Tubular Secretion of Digoxin in the Isolated Perfused Rat Kidney.

Values are means \pm S.D. **; $p < 0.01$, significantly different from control.

さらにジゴキシンの構成糖であるジギトキソースでも阻害しなかったことから、配糖体部分の関与もないことが示唆された。一方、代謝阻害剤である2,4-ジニトロフェノール(DNP)では有意な阻害が認められ、分泌に

はATP加水分解のエネルギーが必要であることが推察された。

以上の結果をまとめると、摘出腎灌流法はジゴキシン腎挙動解析に適していること、ジゴキシンの分泌は、有機カチオン、有機アニオン輸送系とは異なるエネルギー依存的な機構によるものであることが示唆された。

第2節 抗不整脈剤キニジン、ベラパミルとの相互作用

ジゴキシンは、抗不整脈剤キニジン(Fig. 5)と併用されるが、これがジゴキシンの血中濃度を上げ、副作用が惹起されることが临床上問題となっている(24-26)。その相互作用は、分布容積の低下(27-29)、腎排泄の低下(27,28,30)、胆汁排泄の低下(31,32)によるとの報告がある。また、ベラパミル(Fig. 5)も同様の相互作用が認められている(33-35)。ジゴキシンの主たる消失臓器は腎であることから、腎における相互作用は最も重要で

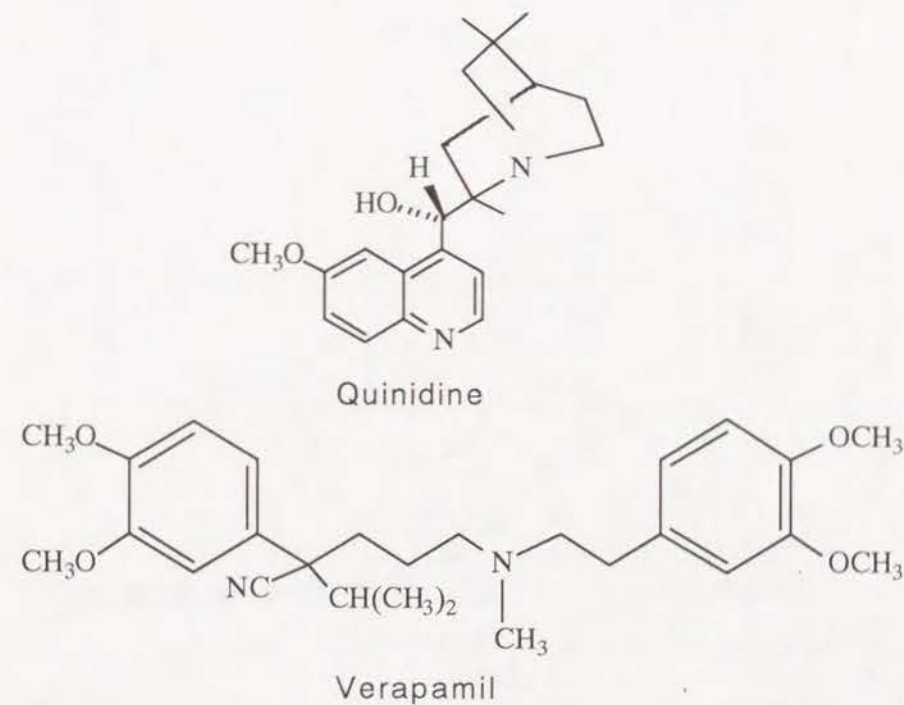


Fig. 5.
Structure of Quinidine and Verapamil.

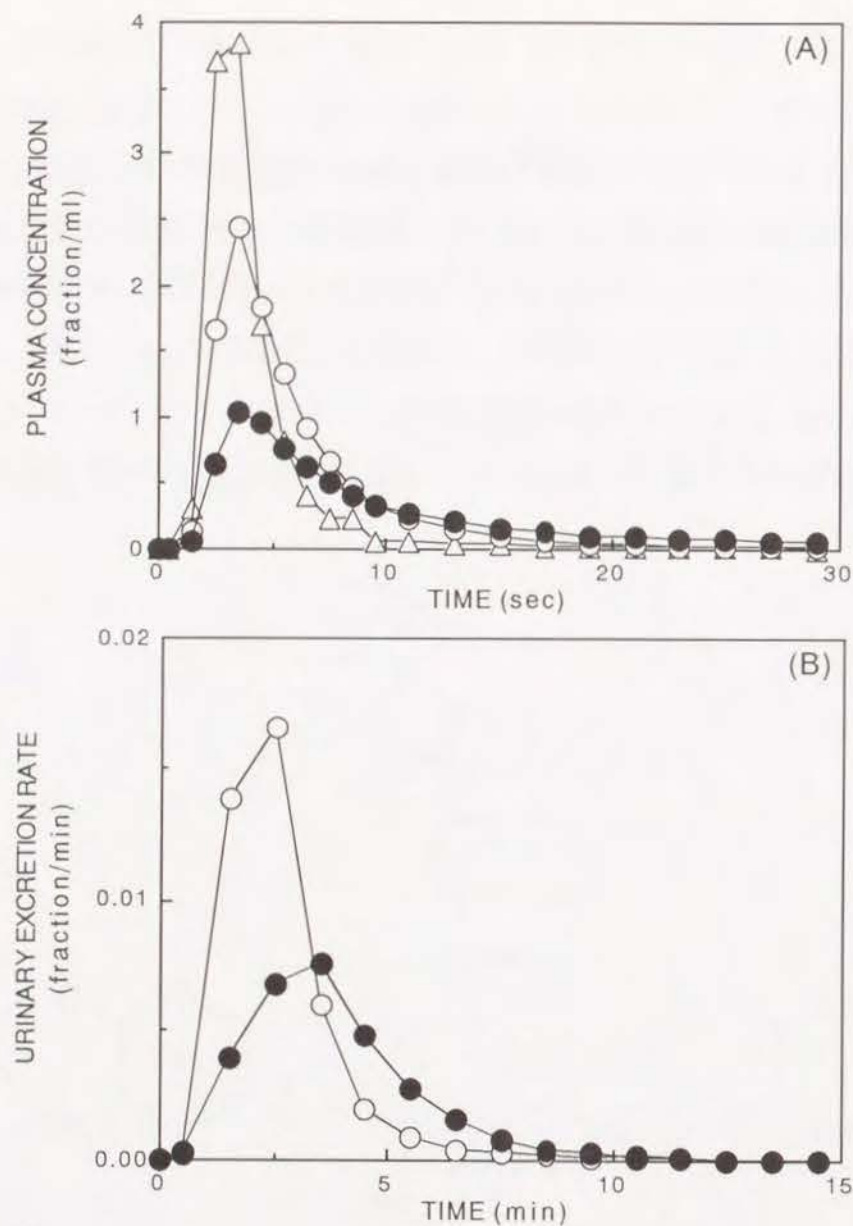


Fig. 6.
Typical Venous (A) and Urinary (B) Outflow Curves of Albumin (Δ), Inulin (○) and Digoxin (●) in the Presence of 8 μM Quinidine in the Isolated Perfused Rat Kidney.

あり、その機構を解明する目的で、キニジン、ベラパミルのジゴキシン分泌に及ぼす影響を検討した。

方法は、摘出灌流腎を用い、灌流液中に一定濃度のキニジン、あるいはベラパミルを添加することにより、その効果を検討した。Fig. 6は、灌流液中にキニジン8 μM存在下で得られた典型的な希釈曲線である。Fig. 3と比較するとジゴキシンの尿中排泄量の低下が認められた。Fig. 7中央

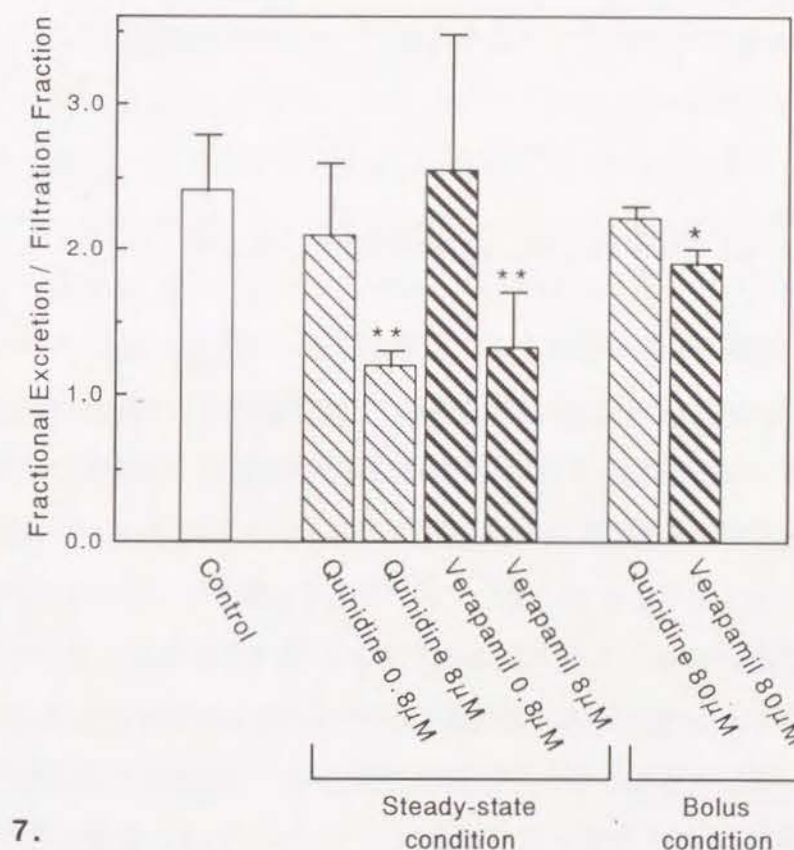


Fig. 7.
Effect of Quinidine and Verapamil on Renal Tubular Secretion in the Isolated Perfused Kidney.
Values are means ± S.D. *, p<0.05, **, p<0.01, significantly different from control.

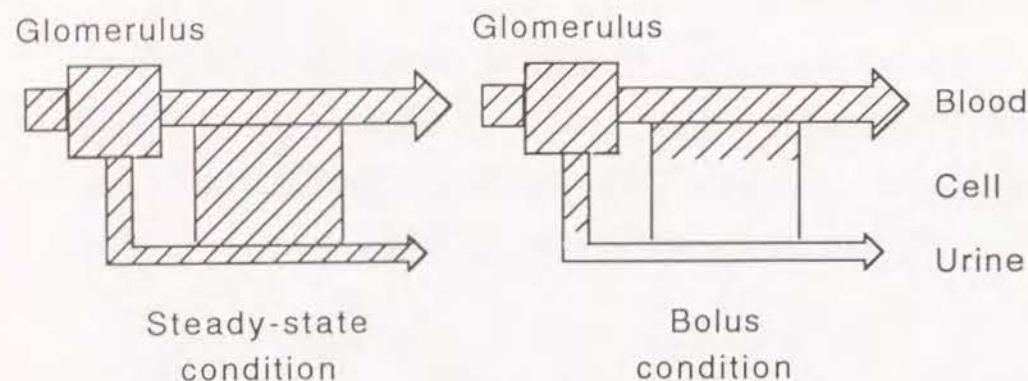


Fig. 8.
Scheme of Two Modes of Inhibitor Administration.

のカラムのようにFE/FFで表すと、キニジン、ペラパミルはジゴキシニン分泌を濃度依存的に阻害した。臨床においては、ジゴキシニン-ペラパミル相互作用はジゴキシニン-キニジン相互作用よりも顕著ではなく、ペラパミルの影響が認められなかった報告もある(27)。これはキニジンの有効血中濃度は数 μ Mであるのに対し、ペラパミルは数百nMと低く、両者の血中濃度の違いによると考えられる。即ち、Fig. 7のように両薬剤とも同程度のジゴキシニン分泌阻害活性はあるものの、臨床使用される濃度の違いのため、ジゴキシニン-キニジン相互作用が臨床的にはより顕著に現われると推察された。

さらに、ジゴキシニン血中濃度は、キニジンの投与量(27)、あるいは血中濃度(29)に依存して上昇することが報告されており、摘出灌流腎における濃度依存的な腎クリアランスの低下とよく一致する。

腎臓における分泌は、血液側から細胞内への移行過程と、細胞内から管腔中への移行過程という二種の性質の異なる膜、即ち側底膜、刷子縁膜を透過する過程が存在する。そこで、キニジン、ペラパミルがジゴキシニンの側底膜透過過程を阻害するのか、刷子縁膜透過過程を阻害するのかを明らかにする目的で、阻害剤の共存状態を変えた実験を行なった(Fig. 8)。一定濃度の阻害剤を添加した灌流液をジゴキシニン投与前から灌流させておく定常状態(Steady-state condition)実験では、腎組織全体に一定濃度分布した状態でのジゴキシニン分泌を検討することができ、Fig. 7中央のカラムのように8 μ Mのキニジン、ペラパミルにより阻害されることが認められた。一方、阻害剤を灌流液には加えず、投与液にのみ加えて、ジゴキシニンと共に瞬時に投与する同時投与(Bolus condition)実験では、阻害剤が十分に細胞内、管腔中に分布してないことから、血管内から細胞内への移行過程は阻害しうるが、細胞内から管腔への移行過程を阻害するには有効な条件ではないと考えられる。結果は、Fig. 7右のカラムのように定常状態実験に比べ10倍濃度でも顕著な阻害は認められなかった。従って、キニジン、ペラパミルはジゴキシニンの細胞内から管腔への移行過程を阻害することが推察された。

Korenらは、イヌを用いたクリアランス実験、膜ベシクルを用いた取り込み実験、multiple indicator dilution実験等で、ジゴキシニンに対するキニジンの影響について検討した結果、クリアランス実験以外では、キニジンの効果は観察されず、キニジンによる腎血流量低下によって腎排泄の低下が引き起こされると結論している(19)。しかし、著者の摘出灌流腎では、血流、血圧を一定に維持しており、キニジン存在下、非存在下でこれらの値が変化しないにもかかわらず、ジゴキシニン分泌に対するキ

ニジンの阻害効果が観察された。従って、ジゴキシノーキニジン相互作用は、血流の変化によるものでなく、刷子縁膜に存在するジゴキシンの輸送機構に対するキニジンの直接作用に起因すると考えられた。

次に、ジゴキシンの側底膜透過過程の機構を明らかにする目的で、ratio plotを行った。Ratio plotとは、Fig. 9に示すように摘出灌流腎から得られる静脈流出液中薬物濃度(C_{PAH} , C_{digoxin})に対するイヌリン濃度(C_{inulin})の比の自然対数を時間に対してプロットしたもので、血管側から細胞内へ特殊輸送系を介して濃縮的に取り込まれる場合、初期に右上がりの直線部分が観察され、この直線の傾きが見かけの細胞内取り込み速度定数を示すことが知られている(11,12,36)。Fig. 9上図には側底膜で有機アニオン輸送系により細胞内に能動的に取り込まれるPAHのratio plotを示した。初期に明らかな右上がりの直線が観察され、有機アニオン輸送系阻害剤プロベネシド共存下、濃度依存的に傾きが小さくなり、取り込み速度定数の低下が示された。一方、下に示したジゴキシンの初期の右上がりの直線が観察されず、キニジン $8\mu\text{M}$ 存在下でも変化は認められなかった。従って、ジゴキシンの側底膜透過過程は特殊輸送系を介する濃縮的な取り込みではなく、受動拡散によるものと推察された。

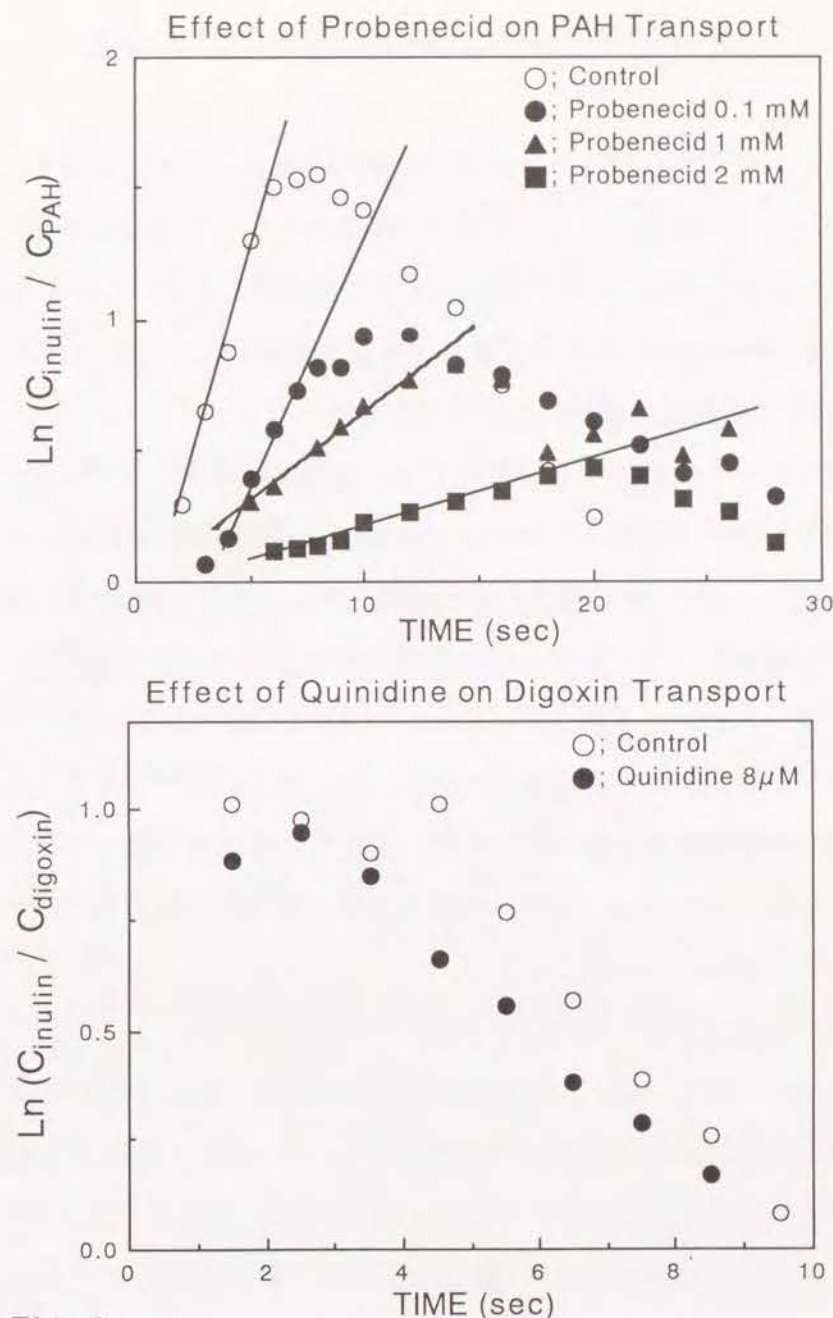


Fig. 9. Ratio Plot of p-Aminohippurate (PAH) and Digoxin in the Isolated Perfused Rat Kidney.

第3節 P-糖蛋白質関連薬剤との相互作用

第1、2節からジゴキシンはエネルギー依存的であり、その過程をキニジン、ベラパミルが阻害するという結果が得られた。この性質は癌細胞の多剤耐性にかかわる輸送系P-糖蛋白質の性質に類似している。またP-糖蛋白質は、腎において近位尿細管刷子縁膜に局在していることが知られている(37)。P-糖蛋白質阻害活性を有するキニジン、ベラパミル(38,39)がジゴキシンの細胞内から管腔への移行過程を阻害するという前節での知見を考え合わせると、ジゴキシン分泌にP-糖蛋白質が関与している可能性が高い。そこでP-糖蛋白質の基質、あるいはその阻害剤として知られている薬物のジゴキシン分泌に及ぼす影響を定常状態実験で検討した。ビンブラスチン、ダウノルビシン、レゼルピン(Fig. 10)はFig. 11に示すようにジゴキシンの分泌を顕著に阻害した。またビンブラスチン同時投与実験では10倍濃度にもかかわらず、顕著な阻害効果が認められなかったことから、キニジン、ベラパミルと同様、細胞内から管腔への移行阻害であると推察された。

ビンブラスチンはビンカルカロイド、ダウノルビシンはアントラサイクリン系薬剤の一種で、構造的に関連性はないが、P-糖蛋白質を発現した癌細胞はこれらの抗癌剤に対して耐性を示し、P-糖蛋白質により輸送される基質であることが明らかにされている(40-42)。またラウオルフィアアルカロイドのレゼルピンはP-糖蛋白質により輸送されるかどうかは明らかとはなっていないが、その輸送を強く阻害し、耐性を克服する作用を有していることが知られている(43)。このように構造も薬理作用も異なる三種の化合物によりジゴキシン分泌が顕著に阻害されたことか

ら、P-糖蛋白質がジゴキシン分泌を担っていることが強く示唆された。

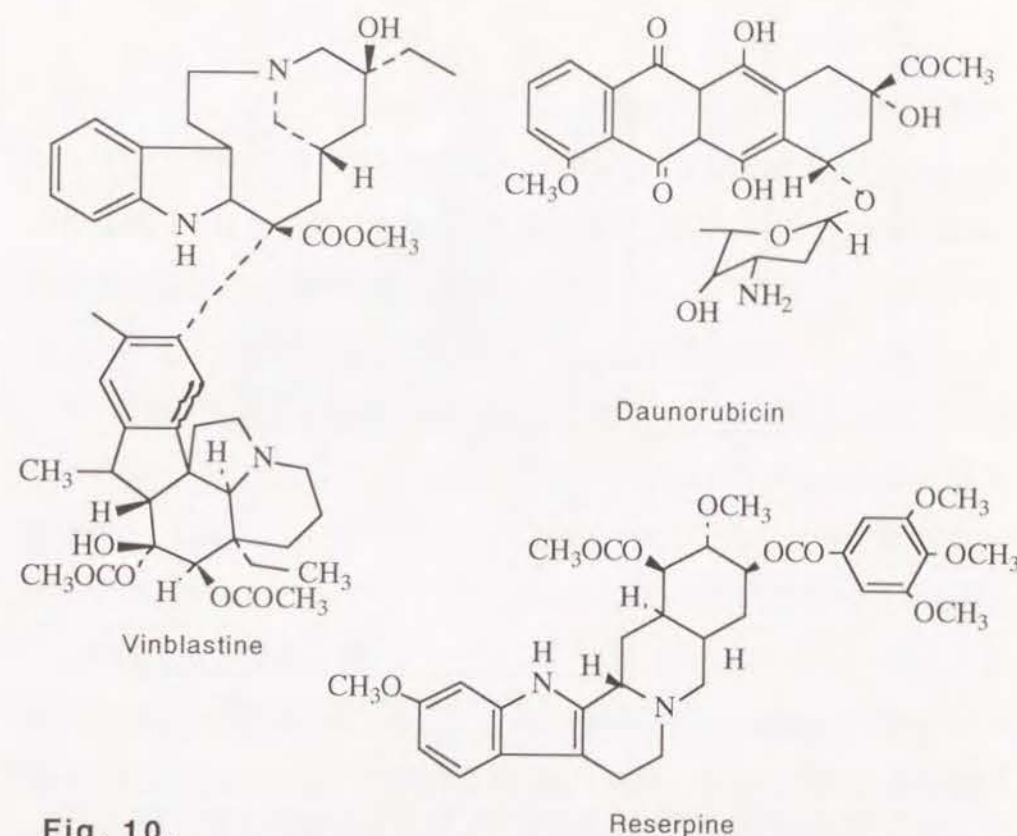


Fig. 10.
Structure of Vinblastine, Daunorubicin and Reserpine.

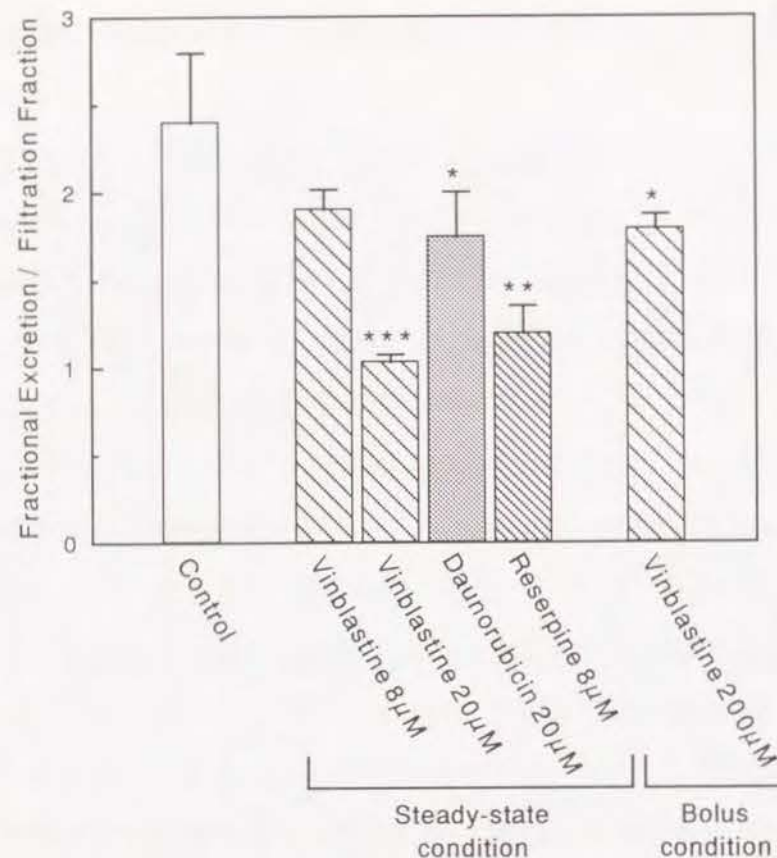


Fig. 11.
Effect of Agents That Bind to P-Glycoprotein on Renal Tubular Secretion of Digoxin in the Isolated Perfused Kidney.
 Values are means ± S.D. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, significantly different from control.

第2章 経細胞輸送評価系の確立とジゴキシン輸送機構の解明

第1章では、ジゴキシンの尿細管上皮細胞内から管腔への移行過程をキニジン、ベラパミルが阻害し、その過程は、有機カチオン、有機アニオン輸送系とは異なるエネルギー依存性輸送であること、またP-糖蛋白質の基質あるいは阻害剤であるビンブラスチン、ダウノルビシン、レゼルピンによりその分泌が大きく低下することが明らかとなった。

P-糖蛋白質は多剤耐性を獲得した癌細胞において過剰に発現していることが発見され、その遺伝子であるMDR1 cDNAから推定される構造は (Fig. 12)、1280アミノ酸残基からなる糖蛋白質で、前半半分と後半半分の相同性が高い。また2ヶ所のATP結合部位と12回の膜貫通部位を有しており、ATP加水分解のエネルギーで構造的に関連性のない各種抗癌剤を能動的に細胞外へ排出する(41,42)。また、腎臓の近位尿細管上皮細胞刷子縁膜、肝臓の胆管側膜、小腸の管腔側膜、副腎、脳の血管内皮細胞等の正常組織にも発現していることが報告され、その生理的役割にも興味を持たれている(37,44-46)。その役割の一つとして、生体異物を体外に排泄するのではないかと考えられているが、薬物の体内動態における寄与を解明した例はない。

第1章で得た結果、並びにP-糖蛋白質が腎臓では刷子縁膜に存在すること、キニジン、ベラパミルがP-糖蛋白質を阻害すること等を考え合わせると、生体にとっての異物であるジゴキシンはP-糖蛋白質により尿中に排泄されていると予想される。そこで本章では、ジゴキシンがP-糖蛋白質によって輸送される基質であることの証明を試みた。即ち、近位尿

細管上皮細胞としての特徴を有するブタ腎由来の細胞株LLC-PK₁に、P-糖蛋白質をコードするMDR1 cDNAを導入し、P-糖蛋白質を過剰に発現させた細胞でのジゴキシン輸送を検討した。

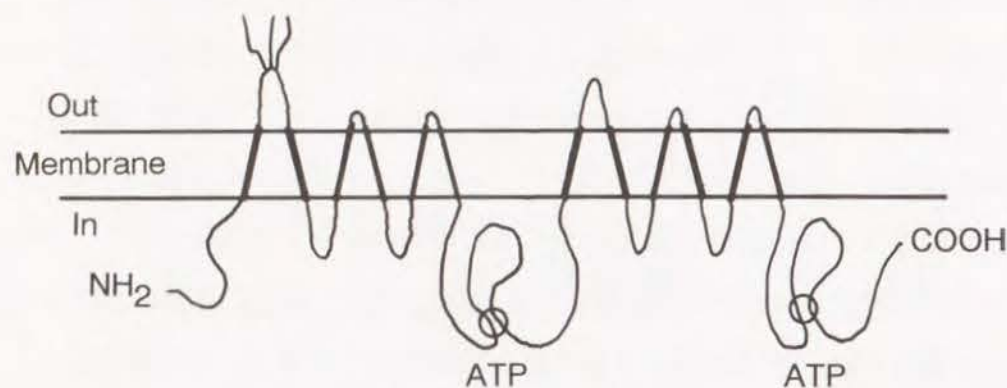


Fig. 12.
Scheme of the Putative Structure of P-Glycoprotein.

第1節 MDR1 cDNAの培養腎上皮細胞LLC-PK₁への導入

ヒト正常副腎から単離したP-糖蛋白質をコードするMDR1 cDNA (47)を含む発現ベクターpSKGAをリン酸カルシウム沈殿法(48)により培養腎上皮細胞LLC-PK₁に導入した(Fig. 13)。ホストとして用いたLLC-PK₁細胞は近位尿細管上皮細胞の性質を示し、単層培養すると細胞間隙に密着結合(tight junction)を形成し、側底膜(basal membrane; 血管側側底膜に相当)を培養皿に接着させ、微絨毛(micro villi)を有する頂側膜(apical membrane; 管腔側刷子縁膜に相当)を培養液側に向けるという性質を有する。また、薬物や栄養物質を方向選択的に輸送することが知られている(49-52)。従って、透過性フィルター上に単層培養することにより、血管側から管腔側、あるいは管腔側から血管側という経細胞輸送を検討するのに適した細胞株である。

用いたプラスミドpSKGAはアデノシンデアミナーゼ(ADA)遺伝子を併せ持つことから、この酵素を発現マーカーとした。即ち、ADAにより無毒化される9-β-D-キシロフラノシルアデニン(Xyl-A)を4 μM及びADAの阻害剤である2'-デオキシコフォルマイシンを10 nMで最初の選別を行った(53)。さらにSouthern blottingによりプラスミド由来DNAが染色体中に挿入されていることが確認できたLLC-GA5について(Fig. 14A)、コルヒチン濃度を段階的(20, 40, 80, 150, 300 ng/mL)に上昇させ、P-糖蛋白質が過剰に発現している株を継代した。樹立した遺伝子導入株LLC-GA5-COL150、LLC-GA5-COL300はそれぞれコルヒチン濃度150、300 ng/mLに対して耐性を示す細胞株である。さらにRNase protection assay、Western blottingによりmRNA、並びにP-糖蛋白質が過剰に発現

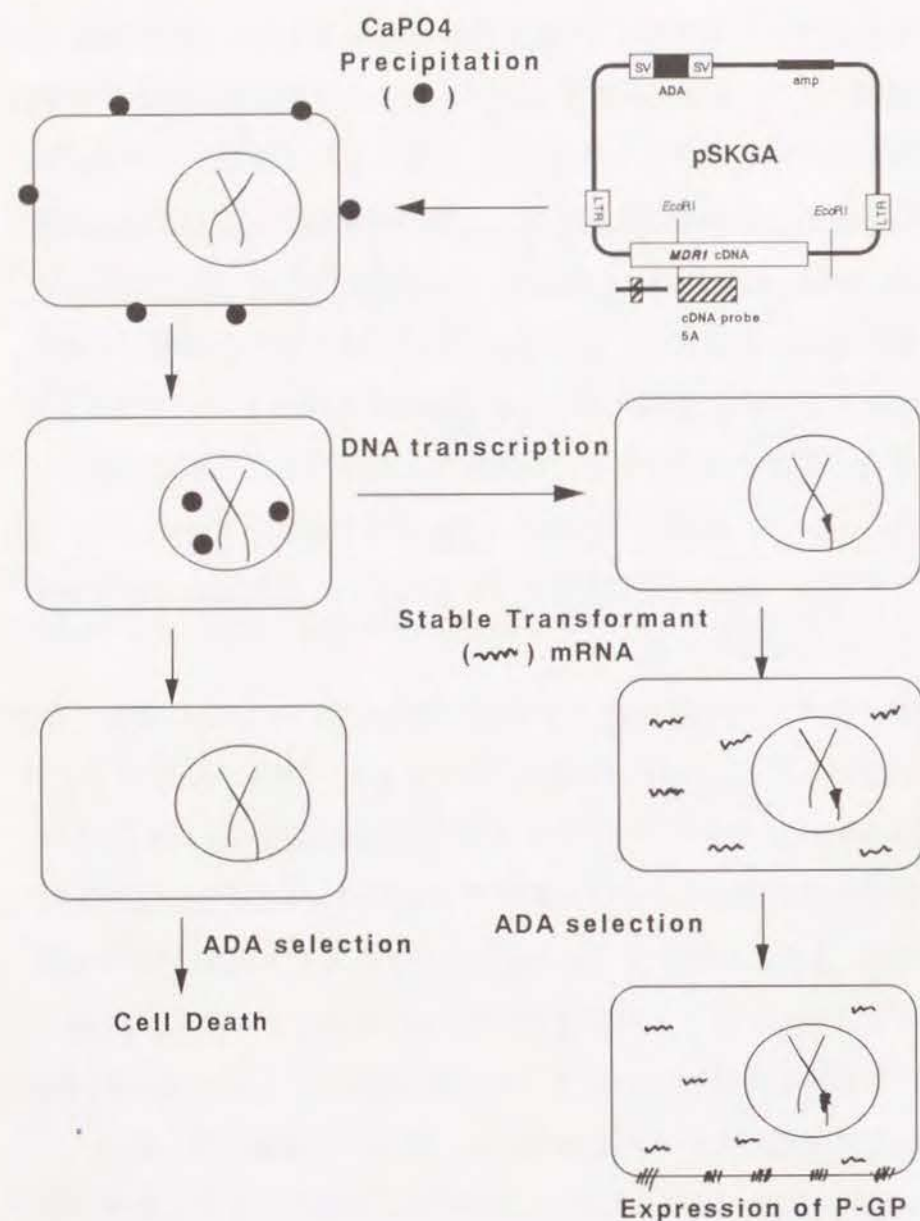


Fig. 13.
Method for Transfection of *MDR1* cDNA to LLC-PK₁ Cells.

していることを確認した(Fig. 14B,C)。またこれらの遺伝子導入株は野生株のLLC-PK₁に比較して、Table 2のように種々の抗癌剤に対して多剤耐性を獲得していた。Fig. 15の写真はP-糖蛋白質のモノクローナル抗体MRK16により頂側膜側を染色したものであるが、野生株が染まらないのに対して、遺伝子導入株は細胞表面が赤く染色され、頂側膜上にP-糖蛋白質が発現していることが確認できた。Fig. 16はimmunogoldと反応させた細胞を電子顕微鏡写真で断面図を写したものである。写真から明らかに、P-糖蛋白質は側底膜には存在せず、頂側膜にのみ局在していることが確認できた。

次に野生株並びに遺伝子導入株を用い、経細胞輸送評価系を確立した。即ち、細胞を多孔性ポリカーボネート膜(TRANSWELL™)上に単層培養し、頂側膜側あるいは、側底膜側に³H標識した基質を含む培養液を添加し、反対側の培養液を経時的に採取することにより経細胞輸送量を測

Table 2

Relative Resistance to Anti-Cancer Agents Compared with LLC-PK₁ Cells.

	Colchicine	Vinblastine	Adriamycin
LLC-PK ₁	1	1	1
LLC-GA5-COL150	25	81	88
LLC-GA5-COL300	54	150	167

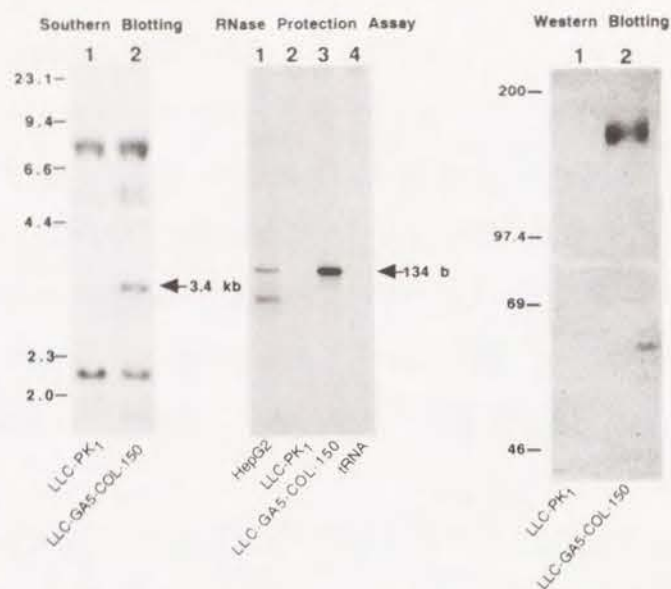


Fig. 14.

A; Southern Blotting for Host (lane 1) and Transfectant (lane 2) Cells. B; RNase Protection Assay for mRNA from HepG2 (lane 1), Host (lane 2) and Transfectant (lane 3) Cells and tRNA (lane 4). C; Western Blotting for Host (lane 1) and Transfectant (lane 2) Cells.

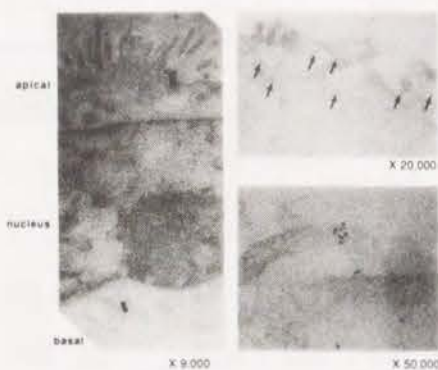


Fig. 16.

Cytochemical Localization of P-Glycoprotein Using Electron Microscopy. Arrows represent gold grains.

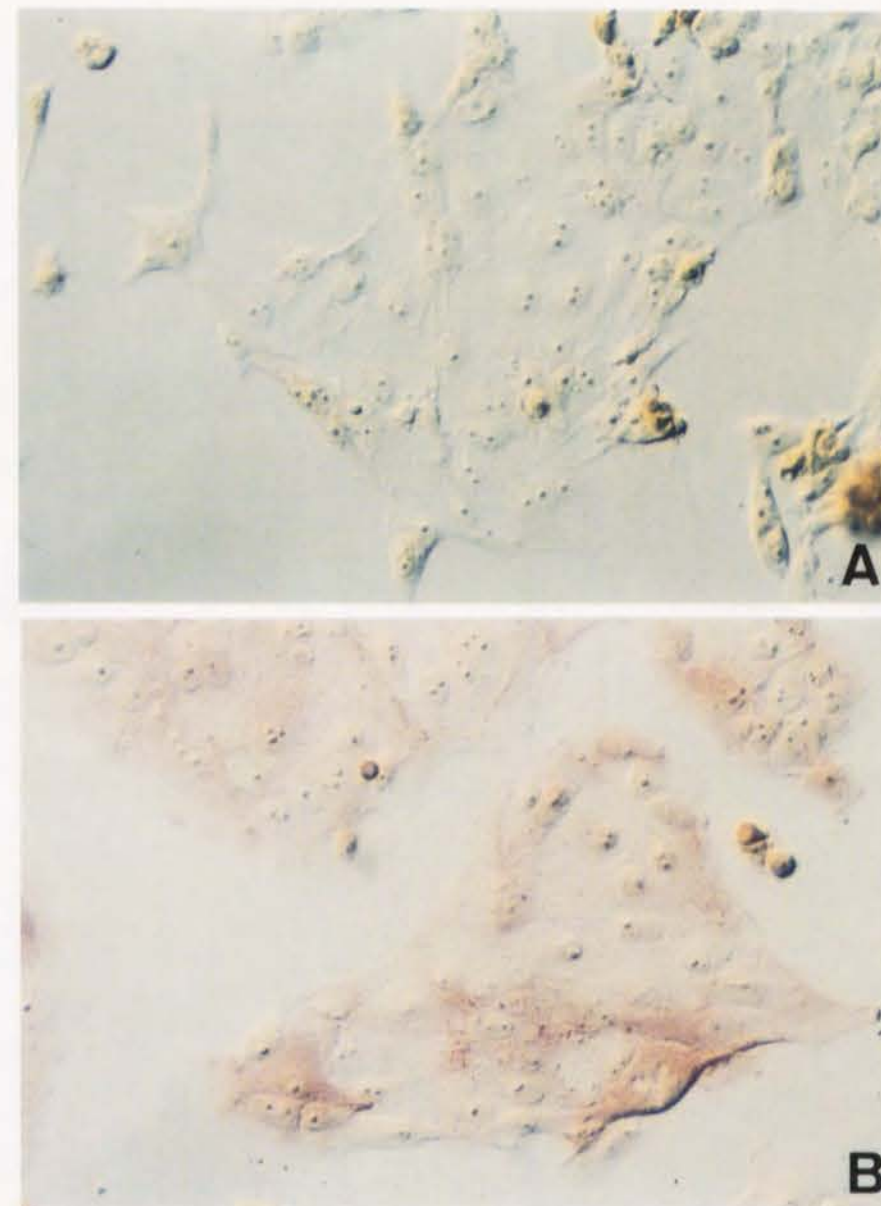


Fig. 15.

Immunostaining for Host (A) and Transfectant (B) Cells Using Monoclonal Antibody MRK16.

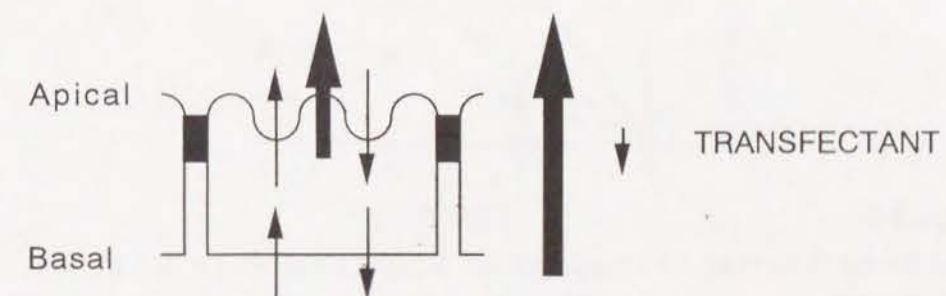
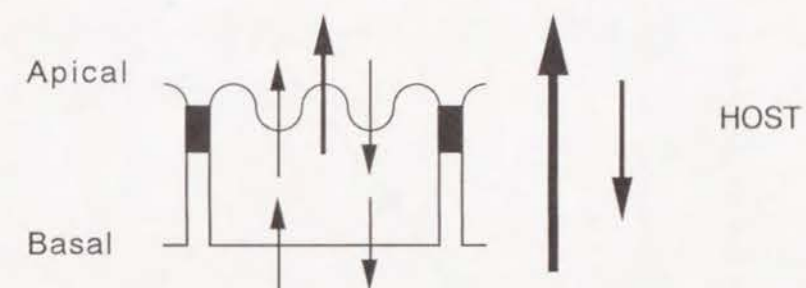
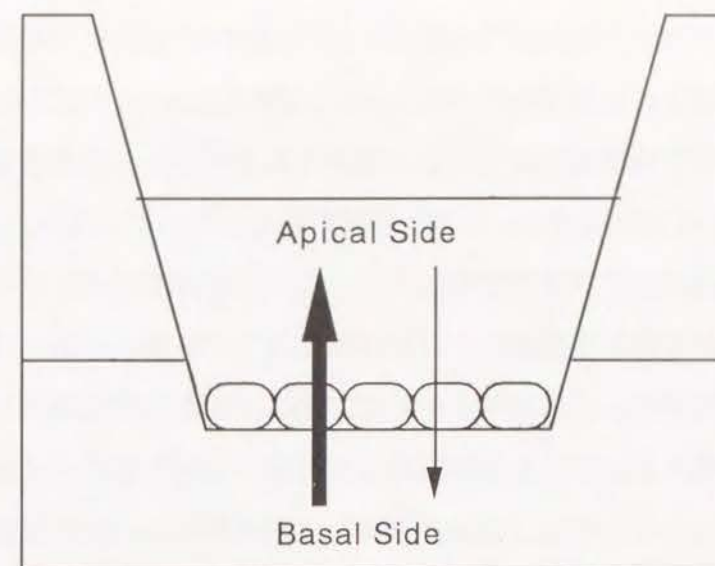


Fig. 17.
Measurement of Transepithelial Transport across
the Cell.

定した(Fig. 17)。なお、細胞間隙の漏れによる影響を ^{14}C 標識イヌリンを同時に添加することによりモニターしたが、1時間あたり1.5%以下と大きなものではなく、阻害剤添加時も変化がなかったことから、特に補正は行なわなかった。この方法を用い、P-糖蛋白質の典型的な基質であるビンブラスチンの経細胞輸送量を測定したところ、野生株に比べ遺伝子導入株では、側底膜側から頂側膜側への輸送は亢進し、頂側膜側から側底膜側への輸送は低下した(Fig. 18)。P-糖蛋白質により輸送される基質は、一般に脂溶性が高く、細胞膜を受動拡散で透過すると考えられる。経細胞輸送が受動拡散のみの場合、側底膜側から頂側膜側への輸送と頂側膜

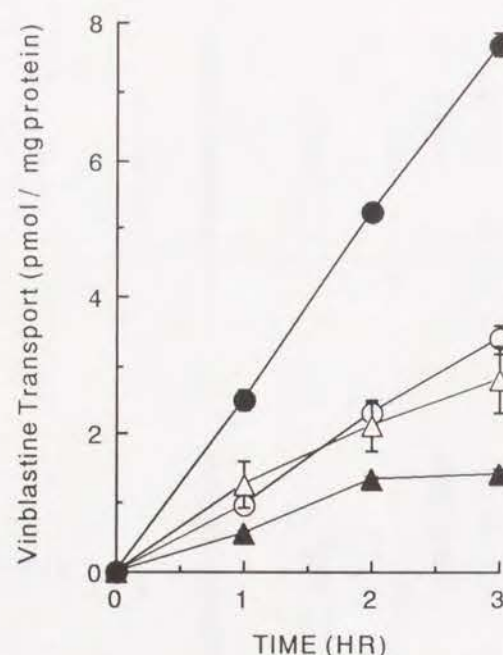


Fig. 18.
Transepithelial Transport of Vinblastine in Host (○, △) and Transfectant (●, ▲) Cells.
 Basal to Apical Transport; ○, ●
 Apical to Basal Transport; △, ▲

側から側底膜側への輸送は同程度になるはずである。しかし、頂側膜上に排出ポンプとしてP-糖蛋白質が存在する場合、P-糖蛋白質により輸送される基質ならば、側底膜側から受動拡散で細胞内に取り込まれた基質はP-糖蛋白質により頂側膜側の培養液へ容易に排出される。逆に頂側膜側から取り込まれた基質は、P-糖蛋白質により再び頂側膜側の培養液へ排出される。従って、経細胞輸送量として観測した場合、P-糖蛋白質の発現量の亢進に伴って、側底膜側から頂側膜側への輸送量が増加し、逆に頂側膜側から側底膜側への輸送量は低下することが予想される(Fig. 17)。この考え方の妥当性は、Horioらによるビンブラスチンを用いた結果によっても支持される(54)。従って、MDR1 cDNA遺伝子導入により頂側膜上に発現させたP-糖蛋白質は、薬物排出ポンプとして機能していることが確認できた。

第2節 P-糖蛋白質を介するステロイドホルモンの輸送

正常組織にもP-糖蛋白質は存在することが見いだされ、その生理的意義について興味をもたれている。いくつかのステロイドホルモンがP-糖蛋白質に対して阻害活性を持つことから内因性基質である可能性が論じられているが(55-57)、実際に輸送された証拠は得られていない。そこで、前節で確立した経細胞輸送評価系の有用性を検討する目的で、種々のステロイドホルモンについて、P-糖蛋白質の基質であるか否かを検討し、Fig. 19に結果を示した。コルチゾール、アルドステロン、デキサメサゾンは野生株に比べ遺伝子導入株では、側底膜側から頂側膜側への輸送が亢進し、逆向きの輸送が低下するという輸送される基質に特徴的なパターンを示した。さらにP-糖蛋白質の阻害剤であるベラパミル存在下でこの方向選択的な輸送は阻害された(Fig. 20)。従って、副腎皮質ホルモンのコルチゾール、アルドステロン並びに合成副腎ホルモンのデキサメサゾンはP-糖蛋白質によって輸送される基質であることが明らかとなった。

一方黄体ホルモンのプロゲステロン、男性ホルモンのテストステロン、卵胞ホルモンのエストラジオール、副腎皮質ホルモンのコルチコステロン、デオキシコルチコステロンはどちらの細胞でも輸送に差はなく、P-糖蛋白質により輸送される基質でも輸送に差はなく、P-糖蛋白質により輸送される基質ではないことが明らかとなった(Fig. 21)。

一般にP-糖蛋白質の基質と認められているものは高脂溶性化合物であり、懸濁細胞や膜小胞を用いた取り込み実験では、細胞膜への非特異的結合が大きく、輸送量と結合量の分離評価が困難であることから、輸送を検討するには適したものとはいえない。それに対して本経細胞輸送評

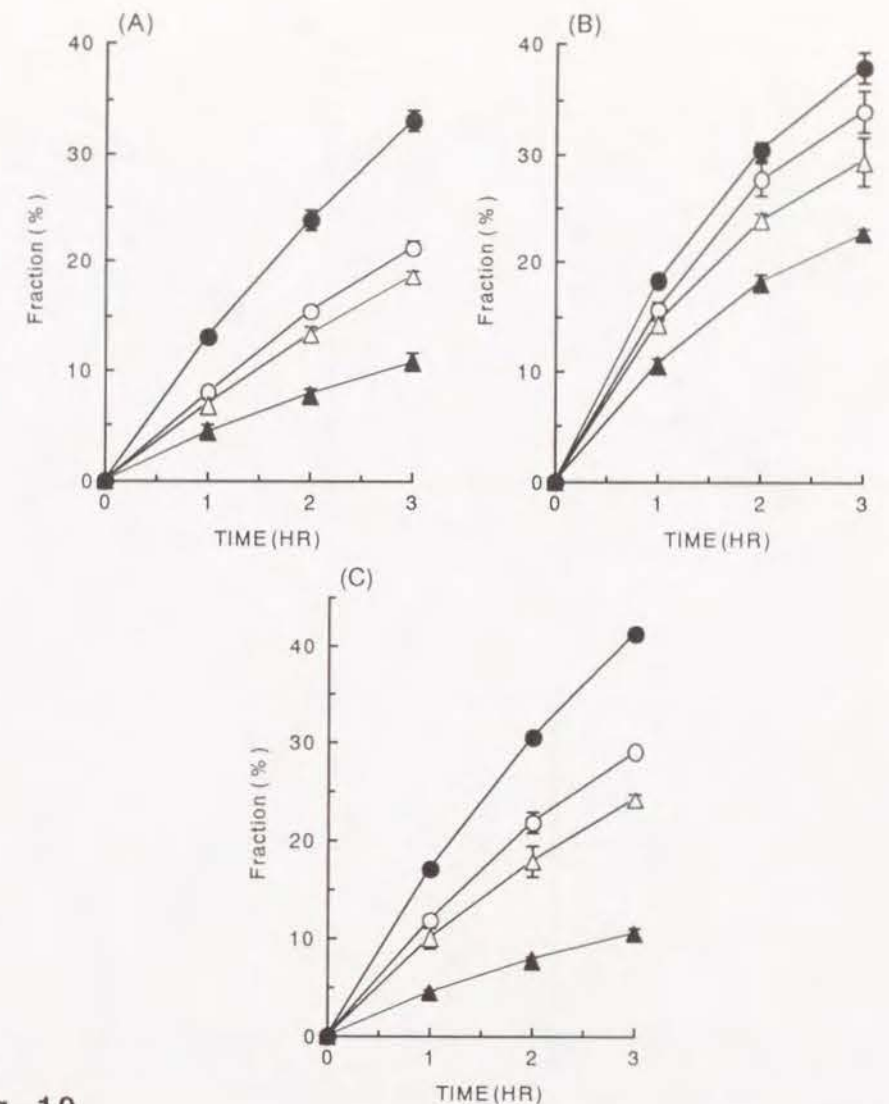


Fig. 19. Transepithelial Transport of Cortisol (A), Aldosterone (B) and Dexamethasone (C) in Host (○, △) and Transfectant (●, ▲) Cells. Basal to Apical Transport; ○, ● Apical to Basal Transport; △, ▲

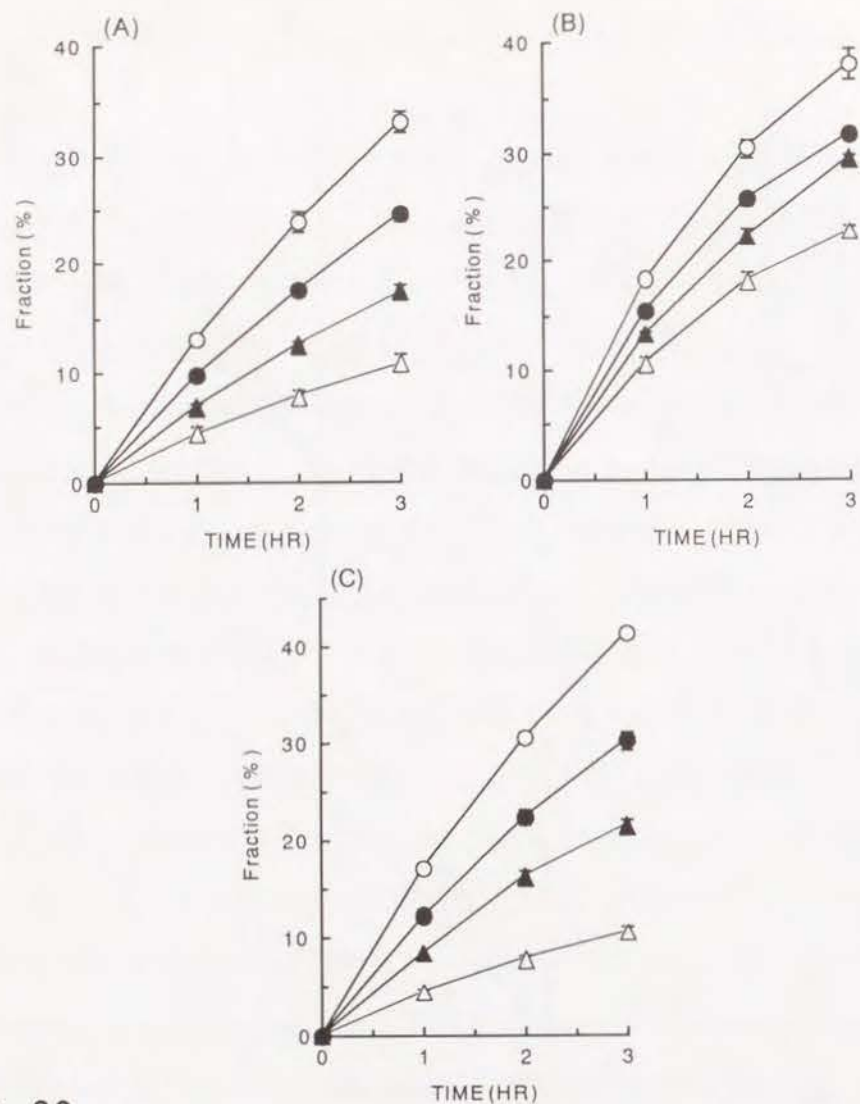


Fig. 20.
Effect of 20 μ M Verapamil on Transepithelial Transport of Cortisol (A), Aldosterone (B) and Dexamethasone (C) in Transfectant Cells.
 without Inhibitor Basal to Apical Transport; ○
 Apical to Basal Transport; △
 with Inhibitor Basal to Apical Transport; ●
 Apical to Basal Transport; ▲

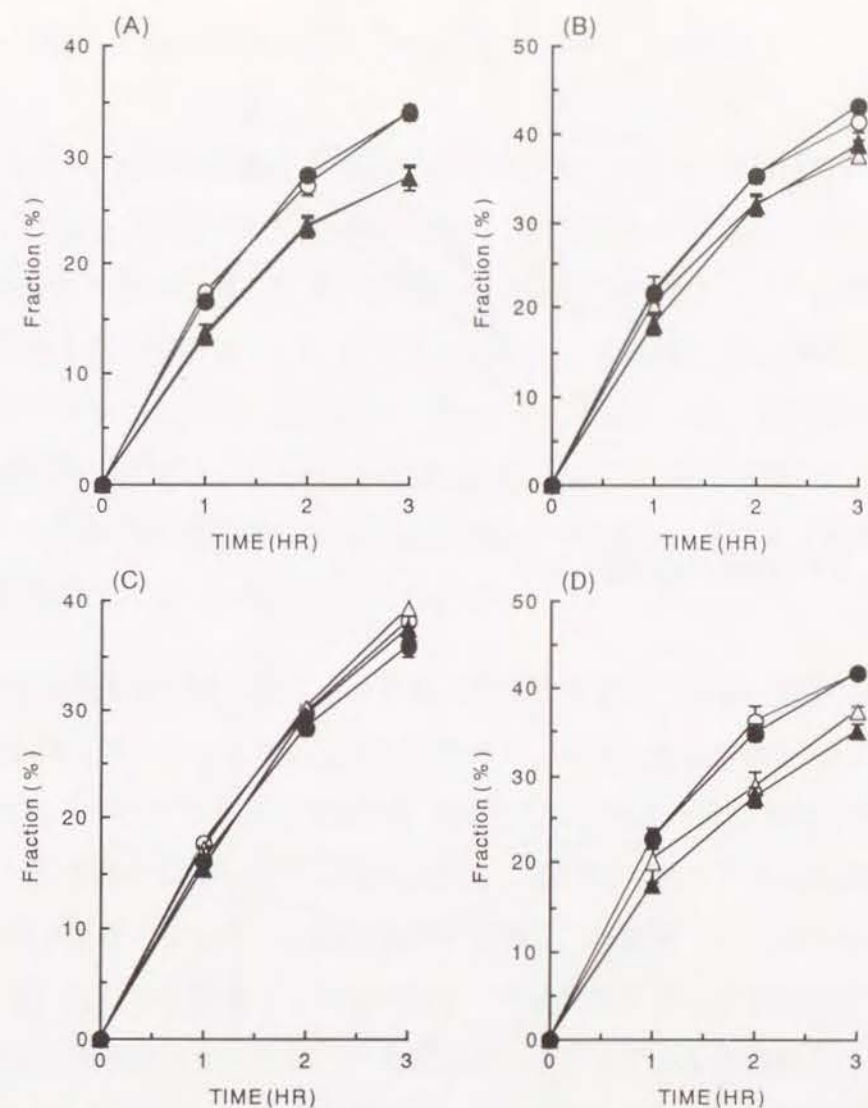


Fig. 21.
Transepithelial Transport of Progesterone (A), Testosterone (B), Estradiol (C), Corticosterone (D) and Deoxycorticosterone (E) in Host (○, △) and Transfectant (●, ▲) Cells.
 Basal to Apical Transport; ○, ●
 Apical to Basal Transport; △, ▲

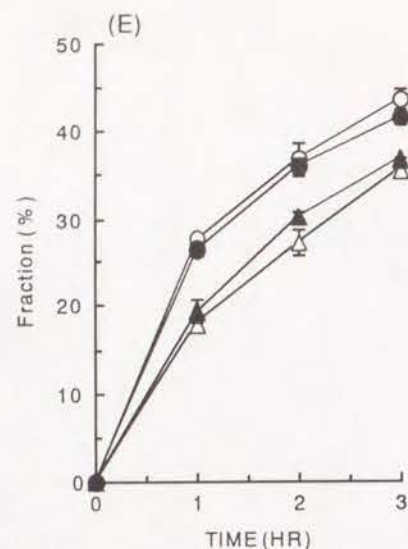


Fig. 21. Continued.

価系は、実際に輸送されてきたものを測定するため、輸送量を直接評価することが可能である。従来、プロゲステロン、テストステロン等は抗癌剤のP-糖蛋白質への結合に対する阻害が強いという結果等から内因性基質と考えられてきたが(55-57)、実際にそれら自身が輸送されたデータは得られていない。著者は、このような脂溶性ホルモンでも輸送を検討できる系を確立し、阻害活性の強いものが必ずしも輸送されるとは限らないという興味ある知見を得ることができた。以上、本経細胞輸送評価系は、P-糖蛋白質による輸送の検討に有用であることが明らかとなった。さらに本法に、point mutation等の手法を応用することにより、P-糖蛋白質の輸送活性調節機構等の解析にも発展が期待できるものと考えられる。

第3節 経細胞輸送評価系によるジゴキシン輸送

本節では、経細胞輸送評価系を用いてジゴキシンがP-糖蛋白質により輸送されるか否かを検討した。方法は1、2節に準じ、TRANSWELL™上に野生株、遺伝子導入株を単層培養し、 $[^3\text{H}]$ 標識したジゴキシンを含む培養液を側底膜側あるいは頂側膜側に添加し、経時的に反対側の培養液を採取することにより経細胞輸送量を測定した。結果は、側底膜側から頂側膜側への輸送、即ち分泌方向の輸送は亢進し、頂側膜側から側底膜側からの輸送、即ち再吸収方向の輸送は低下するという輸送される基質に特徴的なパターンが得られた(Fig. 22)。

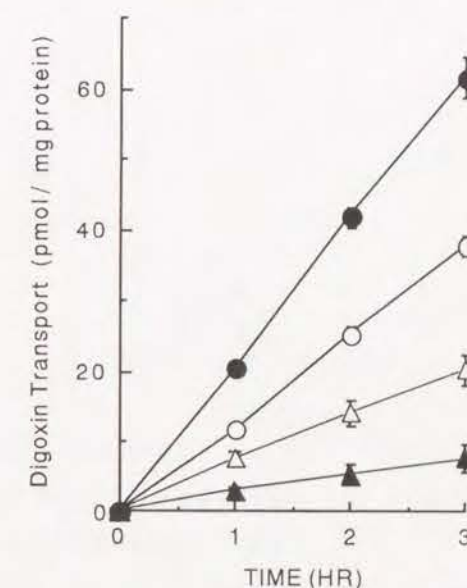


Fig. 22.
Transepithelial Transport of Digoxin in Host (○, △) and Transfected (●, ▲) Cells.
Basal to Apical Transport; ○, ●
Apical to Basal Transport; △, ▲

次に、P-糖蛋白質の基質、あるいは阻害剤として知られているビンブラスチン、キニジン、ベラパミルのジゴキシン経細胞輸送に対する影響を検討した。これら阻害剤共存下では、側底膜側から頂側膜側への輸送は低下し、頂側膜側から側底膜側への輸送は上昇し、輸送の方向性が失われた(Fig. 23)。これは、P-糖蛋白質を阻害することにより受動拡散の寄与が増加したためと解釈できる。従って、ジゴキシンはP-糖蛋白質により輸送されることが明らかとなった。

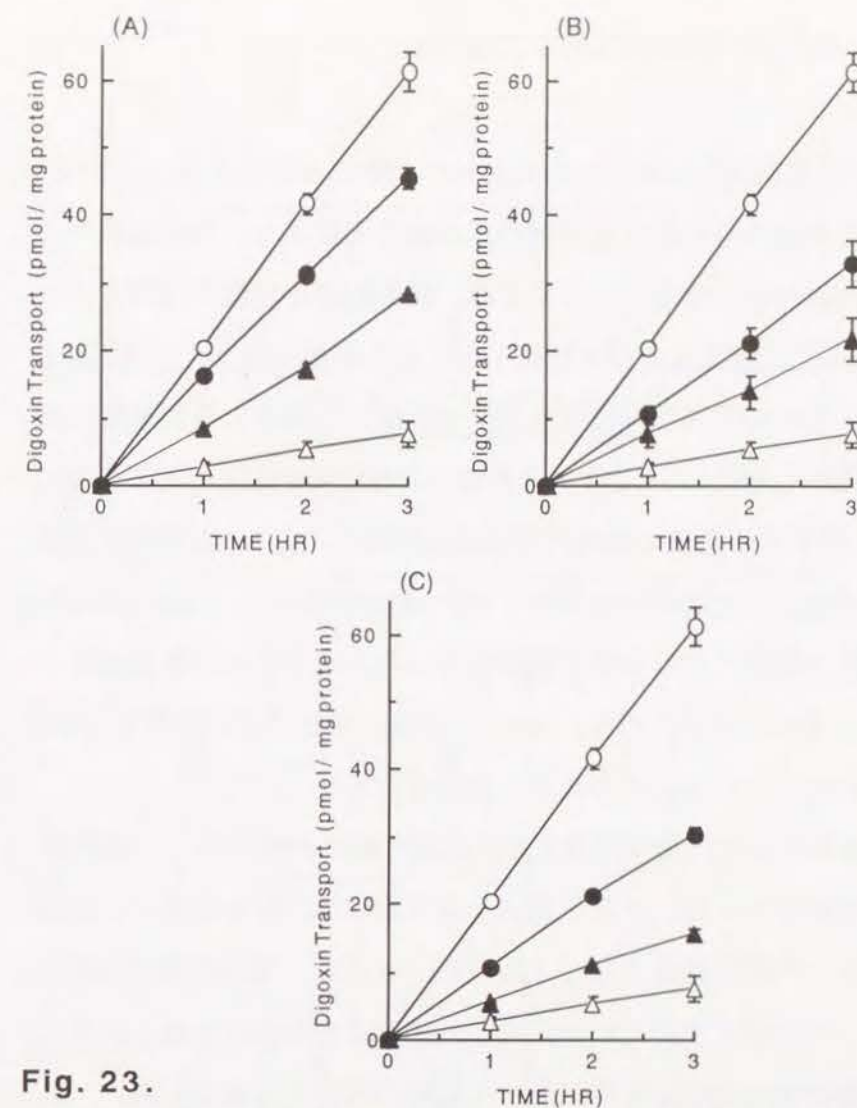


Fig. 23.
Effect of 20 μ M Vinblastine (A), Quinidine (B) and Verapamil (C) on Transepithelial Transport of Digoxin in Transfectant Cells.

without Inhibitor, Basal to Apical Transport; ○
Apical to Basal Transport; △
with Inhibitor, Basal to Apical Transport; ●
Apical to Basal Transport; ▲

第4節 細胞からのジゴキシン排出

P-糖蛋白質は薬物を細胞内から細胞外へ能動的に排出することから、ジゴキシンの細胞からの排出を直接測定することにより、頂側膜側への輸送をより明確に証明することができる。経細胞輸送実験と同様に、TRANSWELL™ に野生株並びに遺伝子導入株を単層培養し、 $[^3\text{H}]$ 標識したジゴキシンを24時間細胞内に取り込ませた後、経時的に頂側膜側、側底膜側の培養液を採取することにより両側への排出量を測定した(Fig. 24)。また、3時間排出させた後の細胞内残存量も測定した。P-糖蛋白質の基質の場合、頂側膜上に選択的に発現したP-糖蛋白質により頂側膜側培養液中へ能動的に排出されるため、受動拡散のみと考えられる側底膜側への排出量より多いと考えられる。またP-糖蛋白質阻害剤の影響も頂側膜側への排出に対してのみ認められると考えられる。

Fig. 25に結果を示す。遺伝子導入株では野生株に比較すると、頂側膜側への排出量が増加した。また、遺伝子導入株では、頂側膜側への排出量が側底膜側への排出量を大きく上回った。さらに、側底膜側への排出量はキニジンの影響を受けないのに対し、頂側膜側への排出量は大きく低下し、頂側膜側への排出阻害に応じて細胞内残存量も増加した。

以上の結果より、頂側膜上に発現したP-糖蛋白質は、ジゴキシンを細胞内から頂側膜側へ排出し、その過程をキニジンが阻害することがさらに明確となった。

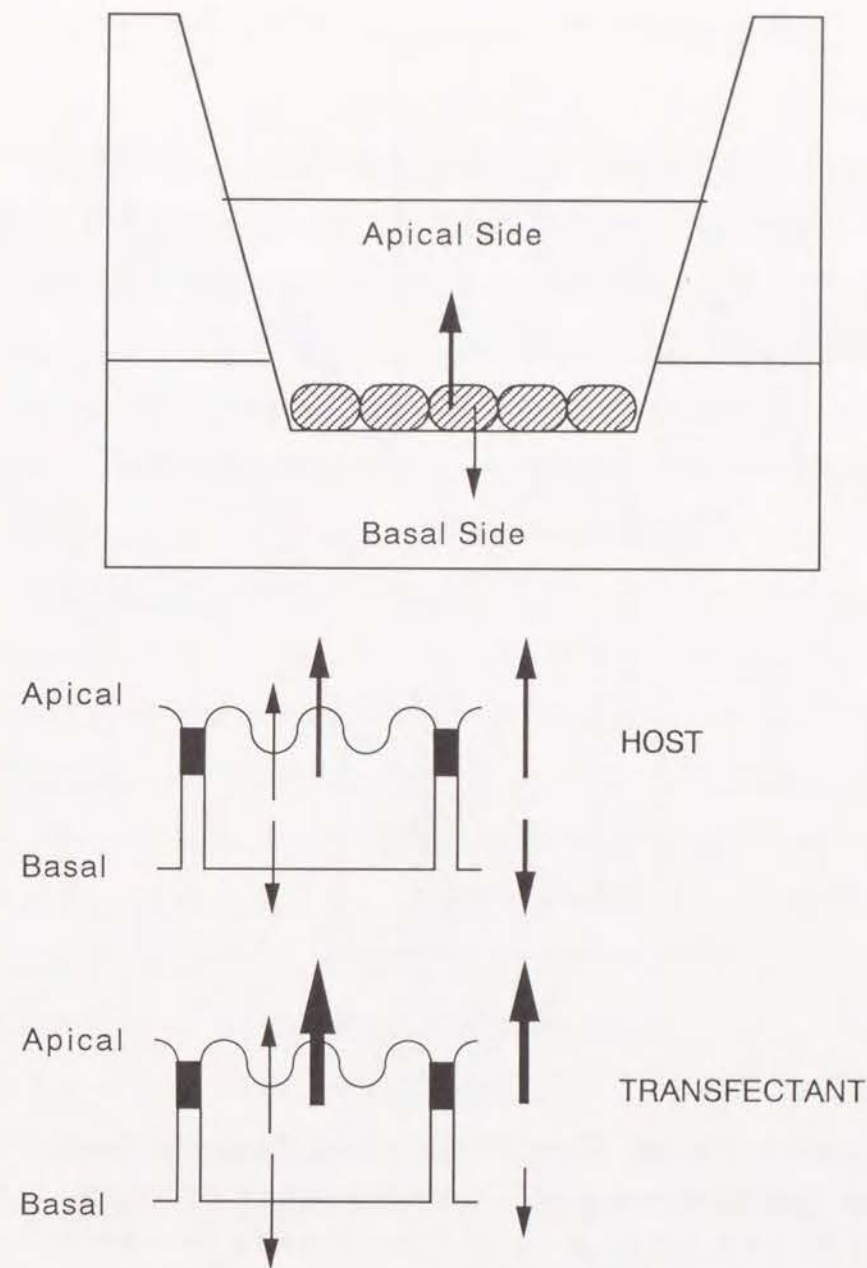


Fig. 24.
Measurement of Digoxin Efflux from the Cell.

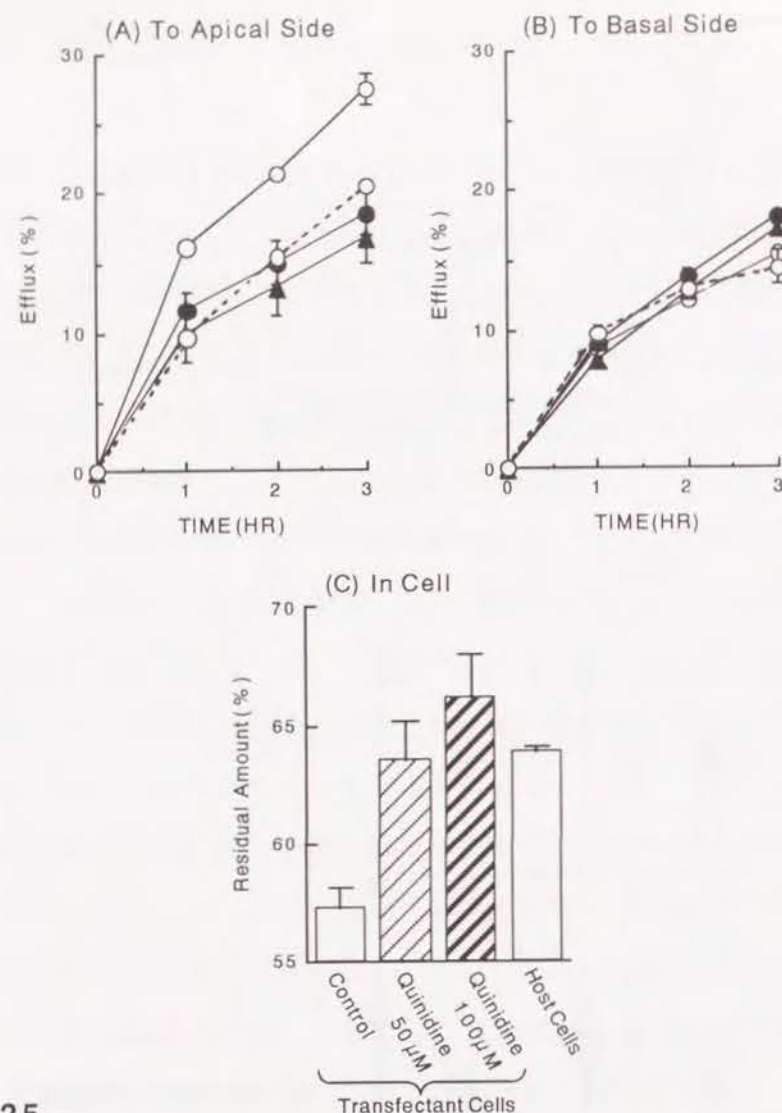


Fig. 25.
Digoxin Efflux from Host (---○---) and Transfectant Cells in the Absence (—○—) or Presence of 50 μM (—●—) or 100 μM (—▲—) of Quinidine to the Apical Side (A) and Basal Side (B) and Residual Amount in the Cells (C) after a 3-hr Efflux.

第5節 ジゴキシン体内動態におけるP-糖蛋白質の関与

以上本章では、ヒトP-糖蛋白質を発現させた細胞株での経細胞輸送、並びに細胞からの排出を検討した結果、ジゴキシンはP-糖蛋白質により輸送される基質であることを明らかにできた。また、第1章の灌流腎での結果と考え合わせると、ジゴキシンは尿細管上皮細胞刷子縁膜のP-糖蛋白質により上皮細胞から管腔へ分泌されることが解明された。さらに、临床上ジゴキシン血中濃度を上昇させるとして、相互作用が問題となっているキニジン、ベラパミルはP-糖蛋白質を阻害することによりジゴキシン腎排泄を低下させ、ひいては血中濃度を上昇させる機構が明らかとなった。

数多くの研究にもかかわらず未だに明らかとされなかったジゴキシン分泌機構について、著者は、抗癌剤に対する多剤耐性の原因である輸送系、P-糖蛋白質に着目し、細胞レベル、臓器レベルでジゴキシンが輸送されることを明らかにした。P-糖蛋白質は腎臓以外の正常組織にも発現しており、ジゴキシン体内動態に及ぼす影響は腎臓以外にも考えられる。特にキニジン、ベラパミルの相互作用は腎排泄だけでなく、分布容積の低下という報告もあり、今回の結果はそれらの機構解明にも重要な基礎的情報を与えるものと言える。ジゴキシンは、尿中に未変化体で70-80%排泄されることから腎排泄が主たる消失経路とされているが、胆管カニュレーションを施し、胆汁クリアランスを測定するとその大きさは腎クリアランスに匹敵する(19,32)。この事実から胆汁中に排泄されたものが、腸管で再吸収され、腸肝循環が起こっていると推察される。一方、*in vivo*実験での分布容積の算出では、肝臓に取り込まれ、胆汁中に排泄され

第3章 ジゴキシンの腎排泄における相互作用予測システムの確立

ジゴキシンは、治療域が狭く中毒域では重篤な副作用を引き起こすことから薬物血中濃度モニタリングに基づく投与設計の必要な薬物である。また临床上併用される薬物が多く、併用薬により体内動態が変動することが少なくない。ジゴキシンは主として未変化体で尿中に排泄されることから、腎排泄に対する相互作用を予測することが副作用防止のためには重要な課題となってくる。前2章を通じて明らかにしてきたジゴキシン分泌におけるP-糖蛋白質の関与から、これまで临床上報告されている相互作用が、P-糖蛋白質を阻害することに起因すること、あるいはP-糖蛋白質を阻害する活性を有する薬剤をジゴキシンの併用する場合、その腎排泄を低下させる可能性があることが予想される。本章ではそのような観点からジゴキシン腎排泄について、経細胞輸送評価系を用いた相互作用予測システムの確立を目指し、ジゴキシンの薬物相互作用について論述する。

てから再吸収を受ける過程に存在する薬物量は、分布容積の中に含まれてしまう。肝臓のP-糖蛋白質がジゴキシン胆汁排泄を担っているとすれば、キニジン、ベラパミルによるジゴキシン分布容積の減少は、肝臓のP-糖蛋白質阻害による腸肝循環の寄与の減少に起因する可能性がある。従って、これら薬物相互作用は腎臓でP-糖蛋白質を介するだけでなく、肝臓でのP-糖蛋白質を介した機構も考えられ、将来検討されるべき課題と言える。

また、Satoらはモルモットでキニジンによりジゴキシンの脳分布が増大するという結果を得、血液-脳関門においてジゴキシンを血中に排出する機構が存在しており、キニジンがこれを阻害すると考察している(58)。P-糖蛋白質は血液-脳関門にも存在しており、脳内に入ってきた生体にとっての異物を血液中に排出していると考えられている(46)。従って、ジゴキシンのP-糖蛋白質により輸送されることを考えると、ジゴキシンを血液中に排出している機構がP-糖蛋白質であり、キニジンはこれを阻害していることが考えられ、脳移行に関してもP-糖蛋白質が大きく関与していることが推察される。

第1節 ジゴキシンスピロノラクトン相互作用機構

スピロノラクトン(Fig. 26)は、カリウム保持性利尿薬として临床上繁用されている。その作用機序は、遠位尿細管および集合管において抗利尿ホルモンアルドステロンのミネラルコルチコイドレセプターへの結合を阻害し利尿を惹起する(59,60)。また、ジゴキシン投与患者(うっ血性心不全)に対して頻繁に併用されるが、ジゴキシンの腎排泄を低下させ、血中濃度を上昇させることが知られており(61-63)、併用にあたっては注意が必要である。その相互作用の分子機構については全く不明であった。

スピロノラクトンはステロイド骨格を有しており、前章第2節で示すようにステロイドホルモンがP-糖蛋白質と相互作用を有することからスピロノラクトンがP-糖蛋白質と何らかの相互作用を持つ可能性が考えられる。また、ジゴキシンは腎尿細管でP-糖蛋白質により分泌されることから、ジゴキシンスピロノラクトン相互作用は、スピロノラクトンに

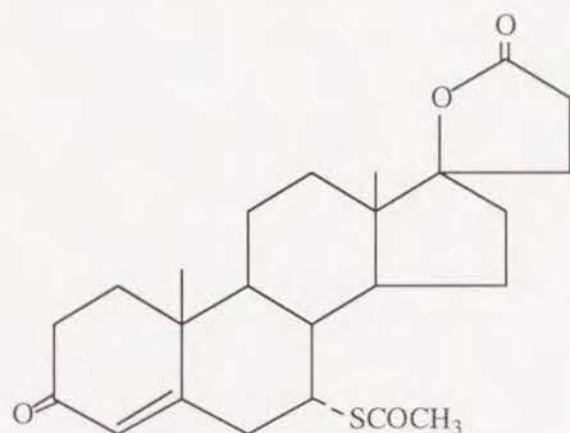


Fig. 26.
Structure of Spironolactone.

よるP-糖蛋白質阻害に起因するというメカニズムが考えられ、相互作用機構の解明を試みた。

まず、スピロノラクトンによるP-糖蛋白質の基質結合の阻害を調べるため、アジドピン結合に対するスピロノラクトンの影響を検討した。アジドピンはP-糖蛋白質に特異的に結合し、光アフィニティラベリングに用いられている薬物である(64,65)。方法は、野生株、遺伝子導入株から細胞膜を分取し、ベラパミルあるいはスピロノラクトン共存下、非共存下で[³H]標識したアジドピンと一定時間反応させ、紫外線を照射後、SDS-PAGEで蛋白質を分離した。スピロノラクトンはベラパミルと同様、濃度依存的にアジドピンのP-糖蛋白質に対する結合を阻害した(Fig. 27)。従って、スピロノラクトンはP-糖蛋白質に対する基質結合を直接阻害することが明らかとなった。

次に、前章で確立した遺伝子導入株を用いた経細胞輸送評価系で、ジゴキシン並びにビンブラスチンの経細胞輸送に対するスピロノラクトンの影響を検討した。ジゴキシンの方向選択的輸送をスピロノラクトンは濃度依存的に阻害した(Fig. 28A,B)。またP-糖蛋白質の典型的基質であるビンブラスチンの輸送をも阻害した(Fig. 28C)。

さらにジゴキシンの細胞からの排出に対するスピロノラクトンの影響を検討したところ、Fig. 29に示すように、頂側膜側への排出は濃度依存的にスピロノラクトンにより阻害され、それに応じて細胞内残存量も増加した。側底膜側への排出量は細胞内薬物量増加に伴い増加した。これは、細胞内濃度の上昇に伴い、受動拡散の寄与が増加したためと解釈できる。従って、スピロノラクトンはジゴキシンのP-糖蛋白質による輸送を阻害することが明らかとなった。

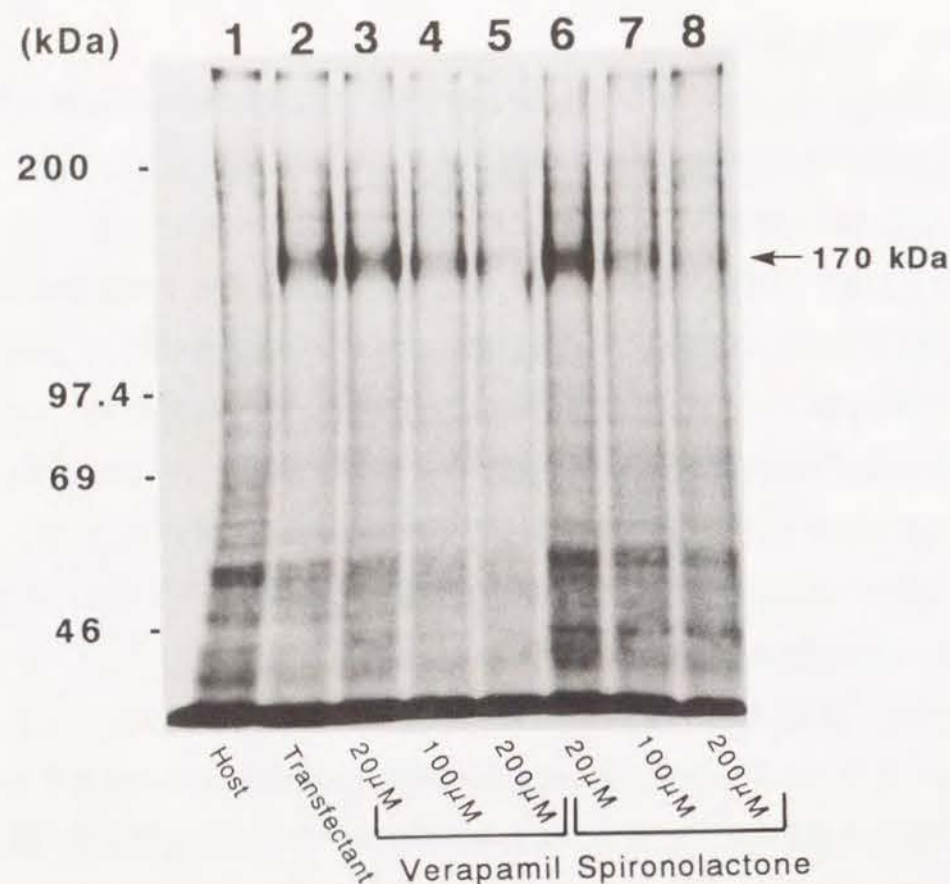


Fig. 27.
Effect of Verapamil and Spironolactone on
[³H]Azidopine Binding to P-Glycoprotein.
 Host; lane 1, transfectant; lane 2-8, with verapamil; lane
 3-5, with spironolactone; lane 6-8.

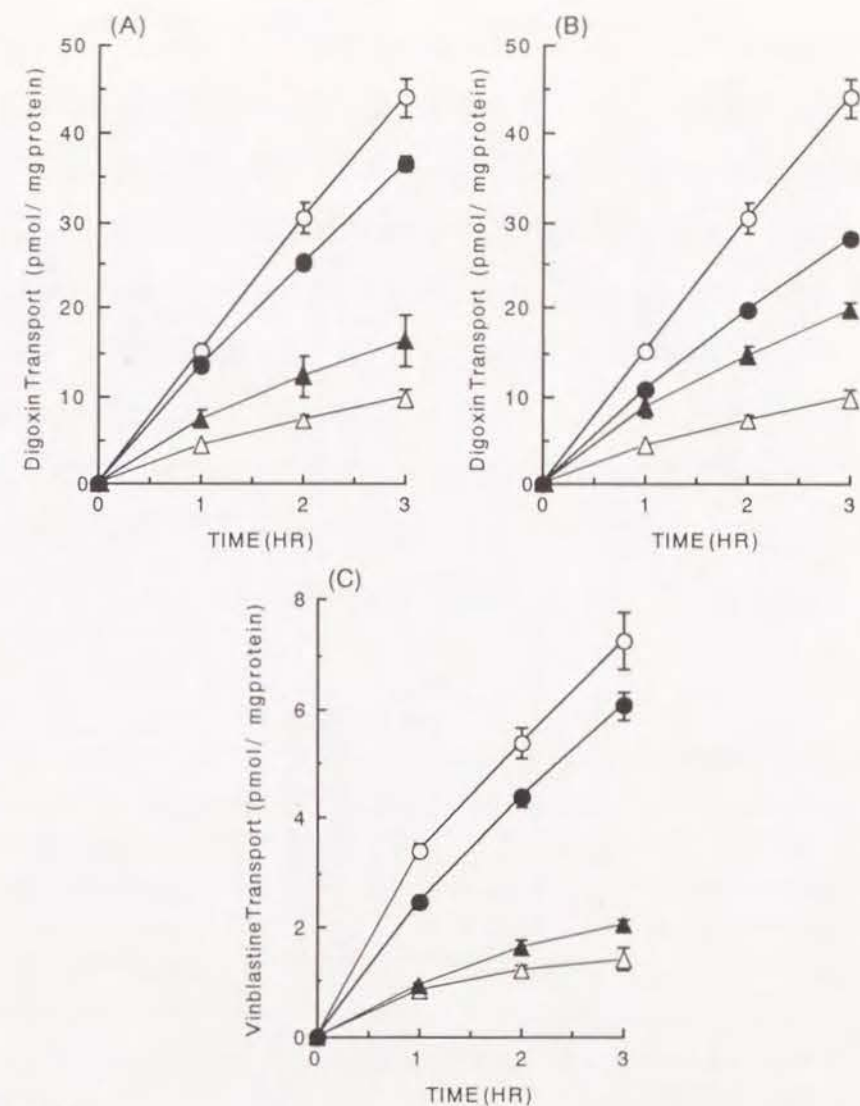


Fig. 28.
Effect of 20 μM (A) or 50 μM (B,C) Spironolactone
on Transepithelial Transport of Digoxin (A,B) and
Vinblastine (C) in Transfectant Cells.
 without Spironolactone, Basal to Apical Transport; ○
 Apical to Basal Transport; △
 with Spironolactone, Basal to Apical Transport; ●
 Apical to Basal Transport; ▲

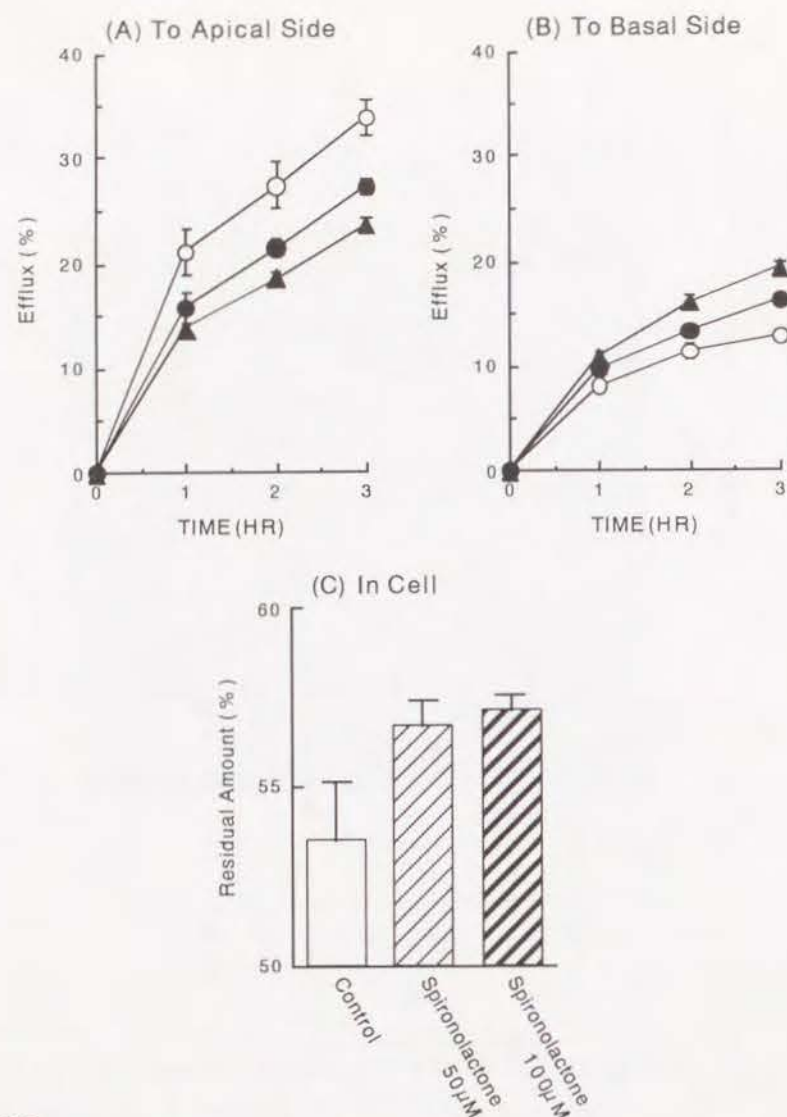


Fig. 29.
Digoxin Efflux from Transfectant Cells in the Absence (○) or Presence of 50 μM (●) or 100 μM (▲) of Spironolactone to the Apical Side (A) and Basal Side (B) and Residual Amount in the Cells (C) after a 3-hr Efflux.

細胞レベルで予測した相互作用が臓器レベルでも起こり得る現象であるかどうかを確かめる目的で、摘出灌流腎を用いてこの相互作用を検討した。方法は第1章に準じ、スピロノラク톤の影響は定常状態実験で検討した。Table 3には摘出灌流腎における血漿流量、尿量、糸球体濾過速度、 Na^+ 、グルコースの再吸収率を示した。スピロノラク톤により、血漿流量、糸球体濾過速度に低下が観察された。この作用についての機構は明らかではないが、灌流液中にアルドステロンが存在していないことから、抗アルドステロン作用ではないと思われる。Fig. 30には、スピロノラク톤存在下、非存在下におけるジゴキシン急速投与後、静脈流出液及び尿から得られる典型的な希釈曲線を示した。尿の希釈曲線から、

Table 3
Experimental Conditions of the Isolated Perfused Kidney.
Values are means \pm S.D. Numbers in parentheses represent the number of experiments.

	PFR ^a (ml/min)	UFR ^b (ml/min)	GFR ^c (ml/min)	FR _{Na⁺} ^d (%)	FR _{Glc} ^e (%)
Control (4)	4.51 \pm 0.15	0.139 \pm 0.025	0.552 \pm 0.071	91.9 \pm 6.2	98.5 \pm 0.4
Spironolactone					
20 μM (4)	5.77 \pm 0.63**	0.112 \pm 0.046	0.355 \pm 0.078**	94.4 \pm 3.8	97.9 \pm 2.1
50 μM (3)	5.28 \pm 0.63	0.114 \pm 0.011	0.347 \pm 0.038**	95.8 \pm 2.6	98.3 \pm 1.4

^a Plasma flow rate.

^b Urine flow rate.

^c Glomerular filtration rate.

^d Fractional reabsorption of Na^+ .

^e Fractional reabsorption of glucose.

** Significantly different from control, $P < 0.01$.

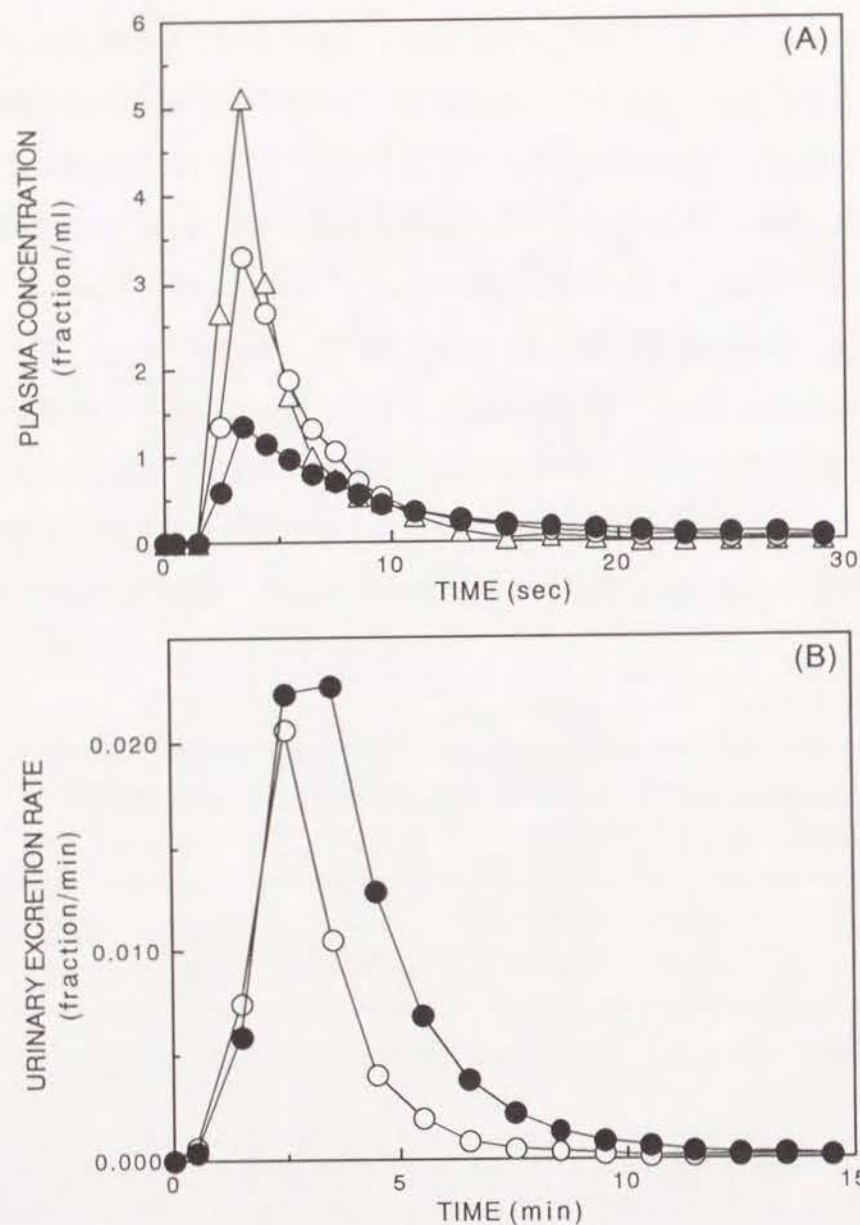


Fig. 30.
Typical Venous (A) and Urinary (B) Outflow Curves of Albumin (Δ), Inulin (\circ) and Digoxin (\bullet) in the Absence of Spironolactone in the Isolated Perfused Rat Kidney.

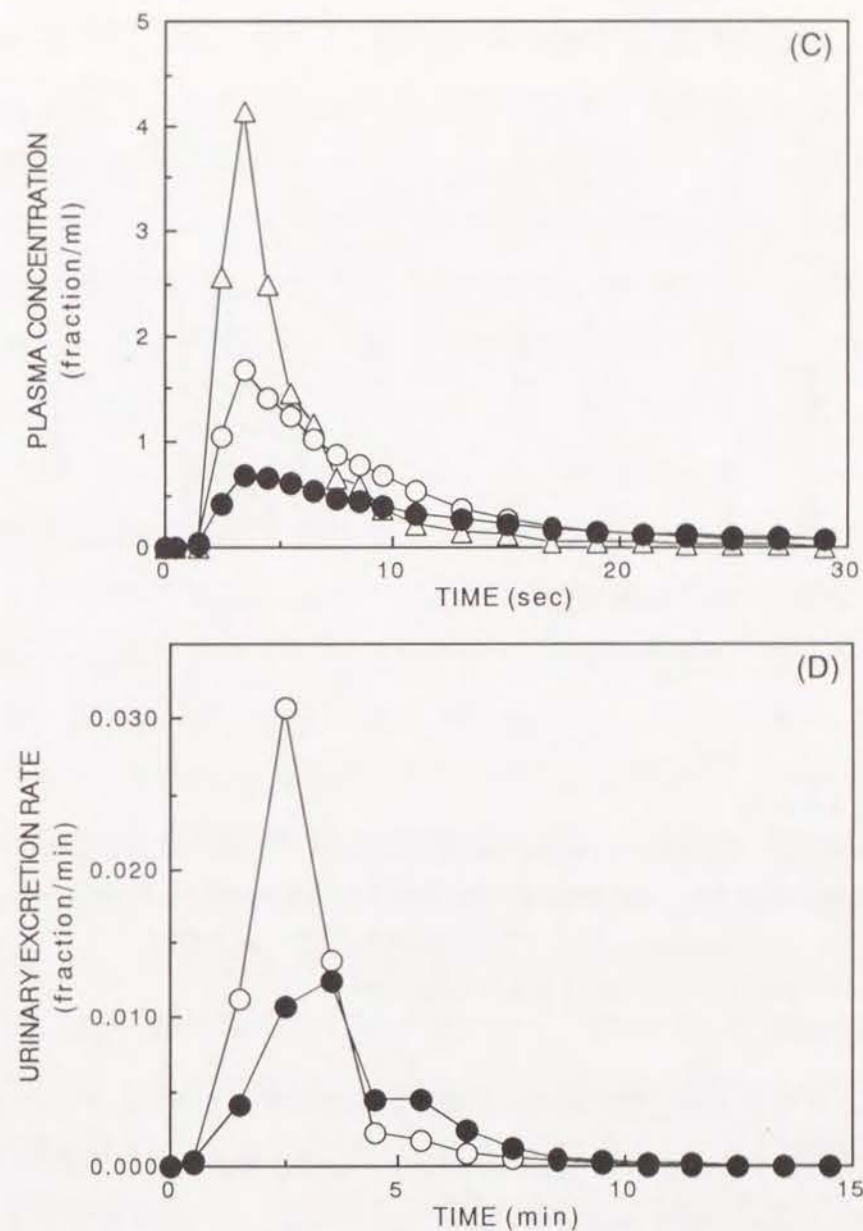


Fig. 30.
Typical Venous (C) and Urinary (D) Outflow Curves of Albumin (Δ), Inulin (\circ) and Digoxin (\bullet) in the Presence of $50\mu\text{M}$ Spironolactone in the Isolated Perfused Rat Kidney.

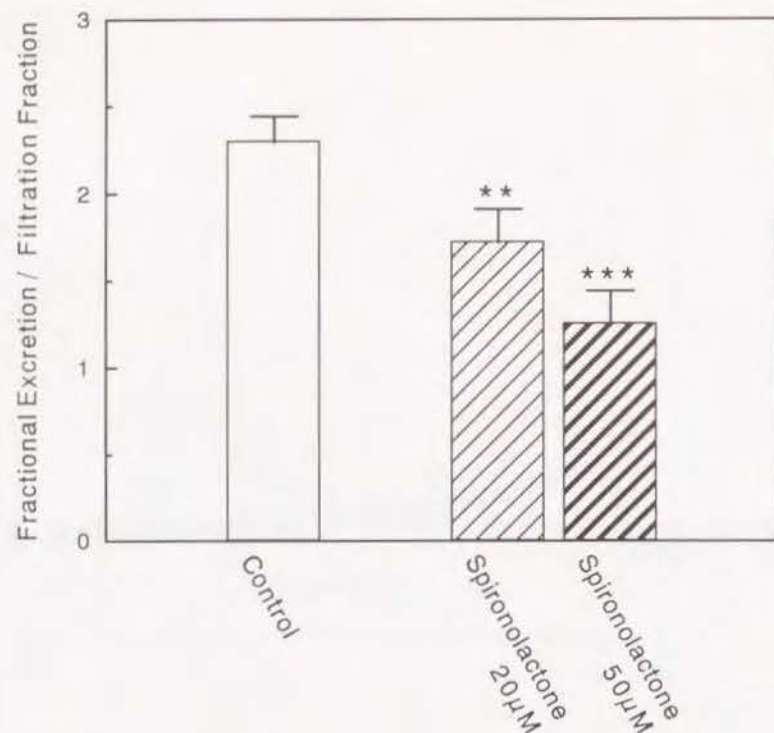


Fig. 31.
Effect of Spironolactone on Renal Tubular Secretion of Digoxin in the Isolated Perfused Rat Kidney.

Values are means \pm S.D. **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, significantly different from control.

スピロノラクトン存在下ジゴキシンの尿中排泄が低下することがわかる。

Fig. 31はスピロノラクトンの影響をFE/FFとしてまとめたものであり、濃度依存的なジゴキシンの分泌阻害が観察された。従って、スピロノラクトンは正常腎臓の尿細管刷子縁膜に存在するP-糖蛋白質を阻害することによりジゴキシンの分泌を阻害し、よってジゴキシンの血中濃度を上昇させるという相互作用機構が明らかとなった。

しかし、阻害効果の観察できたスピロノラクトン濃度は臨床で得られ

る濃度より高く、またスピロノラクトンは代謝物への変換が速いことから(66)、スピロノラクトンのみならず代謝物も分泌阻害に寄与している可能性も否定できない。

ジゴキシンスピロノラクトン相互作用は、腎排泄の低下、分布容積の減少(61-63)が報告されている。著者は種々の実験法を駆使し、腎におけるP-糖蛋白質をスピロノラクトンが阻害し、ジゴキシンの腎排泄を低下させることを明らかにした。O'Brienらはジゴキシンの腎排泄に対するスピロノラクトンの影響とスピロノラクトンの抗ミネラルコルチコイド作用の関係について検討し、ジゴキシンの腎排泄の低下が抗ミネラルコルチコイド作用に先行することから、それらは独立の現象であり、異なるメカニズムによりスピロノラクトンはジゴキシンの腎排泄を低下させると考察している(22)。本実験において、スピロノラクトンの灌流液中にアルドステロンを含まないことから、薬理作用である抗アルドステロン効果は除外して考えることができる。その条件下で、ジゴキシンの分泌が阻害されたことから、薬理効果とは異なる機構、即ち細胞輸送評価系で明らかにしたP-糖蛋白質を介する相互作用が臓器レベルで明らかとなった。

一方、分布容積の低下は、スピロノラクトンが Na^+ , K^+ -ATPaseに対するジゴキシンの結合を置換することから Na^+ , K^+ -ATPaseを介するものと考えられているが(22)、肝のP-糖蛋白質を阻害することによる腸肝循環阻害の可能性も考えられ、今後の検討課題と言える。また、スピロノラクトンがP-糖蛋白質を直接阻害する作用を有する点は、ここで著者が初めて示したものであり、癌細胞の多剤耐性克服に対してスピロノラクトン使用できる可能性が考えられる。

第2節 ジゴキシシン-シクロスポリンA相互作用機構

ジゴキシシンは、P-糖蛋白質により分泌されること、キニジン、ベラパミル、スピロノラクトンはP-糖蛋白質を阻害することによりジゴキシシン分泌を低下させることを明らかにしてきた。これらの結果は、P-糖蛋白質を阻害する薬剤をジゴキシシンと併用した場合、ジゴキシシンの腎排泄を低下させ、よって血中濃度を上昇させる可能性を示すものである。

シクロスポリンA(Fig. 32)は免疫抑制作用のみならず、P-糖蛋白質阻害作用を有することから多剤耐性の克服にも期待されている薬剤である(67-69)。心移植前、あるいは移植手術後の多臓器不全にジゴキシシンとシクロスポリンAが併用される場合が見受けられる。しかしながら、これら両薬剤併用時、体内動態の相互作用に関する情報は皆無に等しい。シクロスポリンAは、上記のようにP-糖蛋白質輸送を強く阻害することが知られており、ジゴキシシン分泌を阻害することにより腎排泄を低下させることが考えられる。そこで、経細胞輸送評価系を用い、ジゴキシシン経

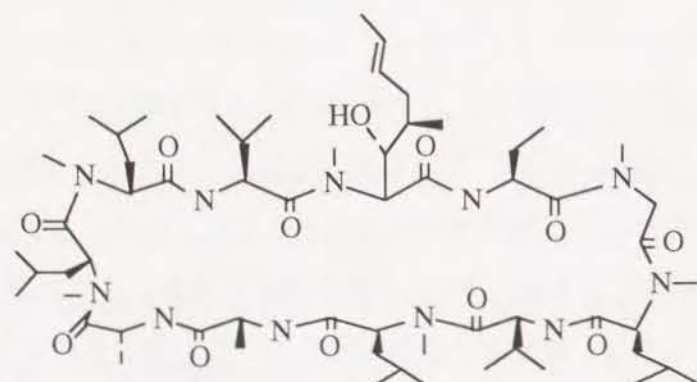


Fig. 32.
Structure of Cyclosporin A.

細胞輸送に対するシクロスポリンAの影響を検討した。Fig. 33に示すように、濃度依存的にジゴキシシンの側底膜側から頂側膜側への輸送を低下させ、一方逆向きの輸送は増加し、P-糖蛋白質によるジゴキシシン輸送を阻害することが明らかとなった。

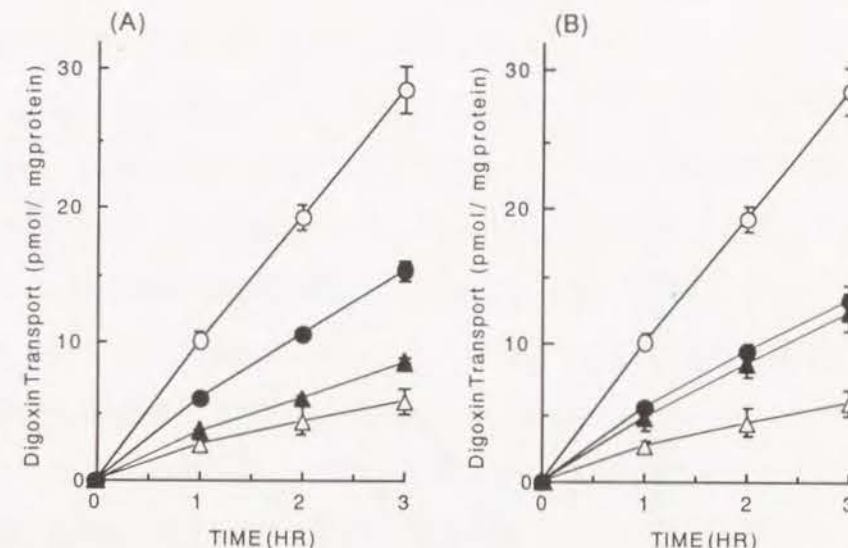


Fig. 33.
Effect of 5 μ M (A) or 10 μ M (B) Cyclosporin A on
Transepithelial Transport of Digoxin in
Transfectant Cells.

without Cyclosporin A, Basal to Apical Transport; ○
Apical to Basal Transport; Δ
with Cyclosporin A, Basal to Apical Transport; ●
Apical to Basal Transport; ▲

第2章第2節で述べたように、P-糖蛋白質を阻害する物質は必ずしもP-糖蛋白質により輸送される基質であることを意味するものではなく、シクロスポリンA自身がP-糖蛋白質により輸送されるかどうかは明らかでない。そこで、同様に経細胞輸送評価系でシクロスポリンAが輸送さ

れる基質であるかどうかを検討した。方法は、TRANSWELL™上に野生株、遺伝子導入株を単層培養し、 $[^3\text{H}]$ 標識したシクロスポリンAを含む培養液を側底膜側あるいは頂側膜側に添加し、反対側の培養液を経時的に採取することにより経細胞輸送量を測定した。Fig. 34に示すように、シクロスポリンAの側底膜側から頂側膜側への輸送は、P-糖蛋白質を発現

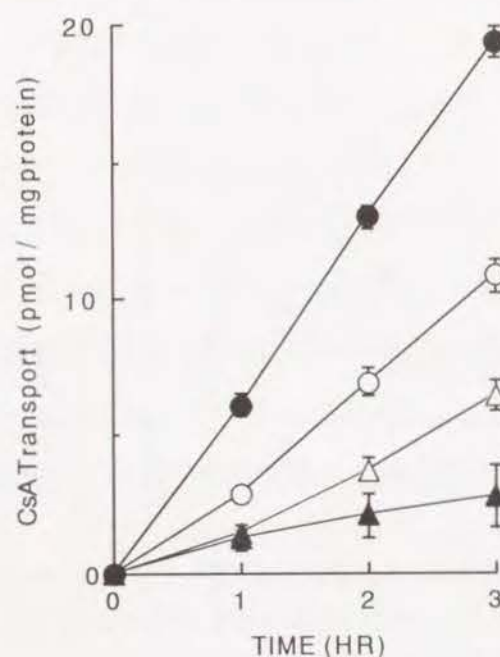


Fig. 34.
Trans epithelial Transport of Cyclosporin A (CsA)
in Host (○, △) and Transfectant (●, ▲) Cells.
 Basal to Apical Transport; ○, ●
 Apical to Basal Transport; △, ▲

させた遺伝子導入株で亢進し、逆向きの輸送が低下したことから、P-糖蛋白質により輸送されることが示された。ただし、シクロスポリンAの体内動態に関しては、尿中に未変化体で排泄される割合は非常に少なく

(70,71)、腎排泄におけるP-糖蛋白質の寄与は小さいものと考えられる。これはシクロスポリンAがほとんど肝臓で代謝を受けること、血漿蛋白結合率が大きくほとんど糸球体濾過を受けないこと(70,71)、尿細管管腔側から何らかの輸送システム(51)あるいは脂溶性のため細胞内に再吸収されること等が原因で、P-糖蛋白質により仮に管腔内へ分泌されても、ジゴキシンのように未変化として尿中出现しないものと考えられる。

次に、ジゴキシシン分泌に対するシクロスポリンAの影響を摘出腎灌流法を用い、臓器レベルで検討した。Table 4に摘出灌流腎における血漿流量、尿量、糸球体濾過速度、 Na^+ 、グルコースの再吸収率を示したが、シクロスポリンAによる影響は認められなかった。結果は、Fig. 35に示すようにシクロスポリンA $1\mu\text{M}$ という通常臨床で使用される濃度で、ジゴキシシン分泌を顕著に阻害し、第一章Fig. 6と比較するとキニジン、ベラパミルより強い阻害活性を有していた。従って、シクロスポリンAは、腎臓の刷子縁膜に存在するP-糖蛋白質を阻害することによりジゴキシシンの腎排泄を低下させることが明らかとなり、併用によりジゴキシシン血中濃度を上昇させ、ひいてはジゴキシシンによる副作用を惹起する可能性が示された。

Dorianらは、ジゴキシシンとシクロスポリンAを併用した患者で、ジゴキシシンの血中濃度が上昇し、副作用である不整脈が惹起されたことを報告している(72)。従って、今後これら両薬剤を併用する場合、ジゴキシシン血中濃度変化に注意して投与することが必要であると言える。

以上の知見より、著者の確立した経細胞輸送評価系は、臓器レベルあるいは*in vivo*で起こりうるジゴキシシン腎排泄の薬物相互作用を予測するだけの検出力を有することが明らかとなった。

Table 4.

Experimental Conditions of the Isolated Perfused Kidney.

Values are means \pm S.D. Numbers in parentheses represent the number of experiments.

	PFR ^a (ml/min)	UFR ^b (ml/min)	GFR ^c (ml/min)	FR _{Na} ^d (%)	FR _{Glc} ^e (%)
Control (4)	4.87 \pm 0.36	0.111 \pm 0.035	0.589 \pm 0.097	96.5 \pm 3.2	97.8 \pm 0.7
CsA 1 μ M (4)	4.59 \pm 0.60	0.144 \pm 0.039	0.632 \pm 0.205	92.9 \pm 3.7	96.9 \pm 2.2
CsA 5 μ M (3)	4.53 \pm 0.56	0.116 \pm 0.018	0.719 \pm 0.139	98.0 \pm 0.2	97.8 \pm 0.6

^a Plasma flow rate.

^b Urine flow rate.

^c Glomerular filtration rate.

^d Fractional reabsorption of Na⁺.

^e Fractional reabsorption of glucose.

癌化学療法の重要な課題の一つに多剤耐性克服がある。ベラパミルが初めて多剤耐性克服剤として発見されたが(39)、その心毒性のため臨床応用が困難であった。現在では、シクロスポリンA、あるいはその誘導体が、P-糖蛋白質輸送に対する阻害活性がベラパミルに比べて強いことから、臨床応用可能な耐性克服剤と考えられている(67-69)。本章ではジゴキシン輸送に対するシクロスポリンAの阻害活性はベラパミル等より強いことが認められた。今回開発した経細胞輸送評価系はジゴキシン腎排泄の相互作用予測のみならず、今後ますます盛んになる多剤耐性克服剤の開発においても簡便なスクリーニング系として有用である。

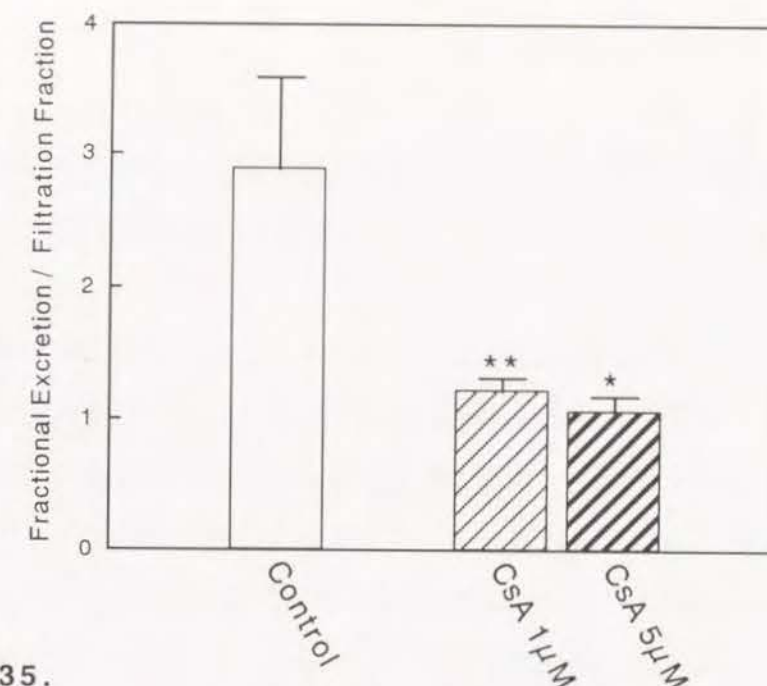


Fig. 35.

Effect of Cyclosporin A (CsA) on Tubular Secretion of Digoxin in the Isolated Perfused Kidney.

Values are means \pm S.D. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, significantly different from control.

以上本章では、ジゴキシンの腎排泄における薬物相互作用の観点から、スピロノラクトン、シクロスポリンAとの相互作用について論述した。薬物相互作用を予測することは、有効かつ安全な薬物療法を行なう上で重要な課題と言える。特にジゴキシンは、古くから心不全の最も代表的な治療薬にもかかわらず、その体内動態、相互作用機構は不明な点が数多く残されていた。しかも治療域が0.8-2.0 ng/mlと非常に狭く、相互作用等の体内動態変化は患者の生命に直接関わるものである。日々開発される多くの新薬とジゴキシンとの薬物相互作用の可能性を、本経細胞輸送評価系を用いて予測できることから、より有効かつ安全な投与設計を行

行なうことができると考える。

結 論

以上3章にわたり、著者は強心配糖体ジゴキシンの腎排泄機構について検討を行なった結果、以下のような結論を得た。

第1章 摘出灌流腎によるジゴキシンの腎排泄機構の解析

摘出灌流腎を用い、ジゴキシンの腎排泄機構を検討した結果、その分泌は腎臓の薬物輸送系として知られる有機カチオン、有機アニオン輸送系とは異なるエネルギー依存的なシステムで行なわれること、ジゴキシンの作用点である Na^+, K^+ -ATPaseは分泌に関与しないことが明らかとなった。临床上相互作用が問題となっている抗不整脈剤キニジン、ベラパミルは腎上皮細胞刷子縁膜で細胞内から管腔への分泌を阻害していることが示唆された。また、P-糖蛋白質の基質あるいは阻害剤として知られるビンブラスチン、ダウノルビシン、レゼルピンでジゴキシンの分泌が阻害されたことより、ジゴキシンの尿細管でP-糖蛋白質により分泌されることが強く示唆された。

第2章 経細胞輸送評価系の確立とジゴキシンの輸送機構の解明

培養腎上皮細胞LLC-PK₁にヒト正常副腎より単離したMDR1 cDNAを導入し、P-糖蛋白質を過剰に発現させた細胞株LLC-GA5-COL150、LLC-GA5-COL300を樹立した。この遺伝子導入株は、頂側膜上に選択的にP-糖蛋白質を発現しており、P-糖蛋白質の基質を細胞外へ排出する機能を有する。得られた遺伝子導入細胞を多孔性ポリカーボネート膜上に単層培養し、P-糖蛋白質の輸送機構解明に有用な経細胞輸送評価系の

確立に成功した。次にこの系を用い、種々のステロイドホルモンの輸送を検討した結果、コルチゾール、アルドステロン、デキサメサゾンがP-糖蛋白質により輸送されることを明らかにし、P-糖蛋白質の内因性基質を見い出すと共に、この系の有用性を示した。さらに、この評価系をジゴキシンの応用し、ジゴキシンのP-糖蛋白質により輸送されることを証明した。第1章の結果と考え合わせると、ジゴキシンは腎尿細管刷子縁膜に存在するP-糖蛋白質により分泌されるという分子機構が明らかとなった。

第3章 ジゴキシン腎排泄における相互作用予測システムの確立

第2章で確立した経細胞輸送評価系による相互作用検出力を検討し、相互作用予測システムへの応用を目指した。临床上相互作用が問題となるスピロノラクトンは、P-糖蛋白質への基質結合を阻害すること、ジゴキシン経細胞輸送を阻害すること、さらに臓器レベルでジゴキシン分泌を阻害することが示され、ジゴキシンスピロノラクトン相互作用はP-糖蛋白質を介する機構であることが明らかとなった。さらに、P-糖蛋白質阻害活性を有するシクロスポリンAは、経細胞輸送評価系においてジゴキシン輸送を阻害した。また、この相互作用は摘出灌流腎を用いた臓器レベルでも起こる現象であることが確かめられた。これらの結果より、第2章で確立した経細胞輸送評価系はジゴキシン腎排泄の相互作用を予測する上で有用であることが示された。

以上著者は、ジゴキシンの腎排泄機構並びに薬物相互作用機構を多角的に検討した結果、癌細胞の多剤耐性に関わる輸送系P-糖蛋白質を介す

る機構を明らかにした。さらにジゴキシン腎排泄における薬物相互作用を予測できるシステムを確立することにも成功した。これらの結果は、ジゴキシンの投与設計を行なう上で重要な情報を与えるものとする。

謝 辞

終わりに臨み、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、京都大学医学部 堀 了平教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、日々有益な御助言、御指導を戴いた京都大学医学部 谷川原祐介講師に深謝致します。

さらに、有益な御助言、御指導を戴いた東京医科歯科大学医学部 乾 賢一教授、京都大学医学部 安原真人助教授、同 高野幹久講師、同 平井みどり助手、並びに京都大学医学部附属病院薬剤部の諸氏に深く感謝致します。

また、遺伝子導入にあたり、技術、試料を御提供くださり、有益な御助言を戴いた京都大学農学部 駒野 徹教授、植田和光助手、木岡紀幸助手、佐伯 徹修士に感謝します。

実験の部

第1章 摘出灌流腎によるジゴキシン腎排泄機構の解析

試薬：12 α [^3H]標識ジゴキシン(677.1 GBq/mmol)、[^{14}C]標識イヌリン(0.38 GBq/g)、[^{14}C]標識パラアミノ馬尿酸(PAH)(1.74 GBq/mmol)はNew England Nuclear (Boston, MA)より購入した。[^3H]標識イヌリン(27.7 GBq/g)はAmersham Corporation (Buckinghamshire, UK)より購入した。非標識ジゴキシン、テトラエチルアンモニウム(TEA)、非標識PAH、ウアベイン、2,4-ジニトロフェノール(DNP)、キニジン、ペラパミルはナカラテスク (京都) より、ビンブラスチン、ダウノルビシン、ジギトキソースはSigma Chemical Corporation (St. Louis, MO)よりそれぞれ購入した。他の試薬はすべて市販品特級を用いた。

手術：Wistar系雄性ラット(225-280 g; 255 \pm 11 g)をペントバルビタール(40 mg/kg, ip)麻酔下Nishiitsutsuji-Uwo らの方法により摘出した(73)。即ち、尿管、静脈にそれぞれポリエチレンチューブ(PE-10, id: 0.28 mm, od: 0.61 mm, Clay Adams, Hibiki od: 2 mm)でカニューレーションを施し、血流を途絶えさせることなく、灌流用チューブの先端に装着した20 Gの注射針(テルモ)を腸間脈動脈を経由して腎動脈内に留置した。直ちにラットを出血死亡させ、20分間灌流して灌流腎を安定化させた後、実験に供した。腎機能の指標として、糸球体濾過速度、Na $^{+}$ 、グルコースの再吸収率を求めた。

灌流液：16-19 %牛赤血球、5 %牛血清アルブミン(BSA; Organon Teknika)、8 種のアミノ酸 (0.5 mM メチオニン、2.0 mM アラニン、5.0 mM グリシン、2.0 mM セリン、1.0 mM アルギニン、2.0 mM プロリン、1.0 mM イソロイシン、3.0 mM アスパラギン酸)、3 %マンニトール、0.1 %グルコース、100 μ g/mlクレアチニンを含むKrebs-Henseleit bicarbonate buffer (KHBB)を用い灌流した。牛赤血球は屠殺後採取したものを、KHBBで3回洗浄後に用いた。他の試薬はすべて市販品特級を用いた。灌流はペリスタポンプ(Mitsui Scientific Ind.)を用い、流量一定で行ない、水銀柱で灌流圧をモニターした。

ジゴキシンの急速投与実験：投与液は、血管内容積マーカーエバンスブルー標識アルブミン(5% BSA、1.7mg/ml エバンスブルー)、細胞外液並びに糸球体濾過マーカー 14 C標識イヌリン(1.03 mg/ml、0.37 MBq/ml)、 3 H標識ジゴキシンの(4 μ M、1.48 MBq/ml)を含むKHBBを用い、50 μ lを腎動脈から急速投与後、静脈流出液並びに尿を経時的に採取、また実験終了直後に腎臓を摘出し、重量測定後ホモジナイズし、薬物濃度を測定した。血液流量並びに尿流量は、各試料の重量を測定し、比重1として算出した。静脈流出液は重量測定後直ちに遠心し、血球を分離した。ジゴキシンは、尿採取用マイクロチューブへの非特異的吸着が大きいことから、重量測定後、10%BSA含有生理食塩水を100 μ l添加して吸着を除去後、定量に供した。ジゴキシンの分泌量は、ジゴキシンの糸球体濾過率(FF; Filtration fraction、イヌリンの排泄率にジゴキシン非蛋白結合率80%から算出)に対する尿中排泄率(FE; Fractional Excretion)の比(FE/FF)として表した。

PAHの急速投与実験：ジゴキシンの準じて行った。灌流液には、11-13 %牛赤血球、8 種のアミノ酸、1 %マンニトール、0.1 %グルコース、100 μ g/mlクレアチニンを含むKrebs-Henseleit bicarbonate buffer (KHBB)を用いた。投与液は、血管内容積マーカーエバンスブルー標識アルブミン(5% BSA、1.7mg/mlエバンスブルー)、細胞外液並びに糸球体濾過マーカー 3 H標識イヌリン(53 μ g/ml、1.48 MBq/ml)、 14 C標識PAH(0.1mM、0.21 MBq/ml)を含むKHBBを用い、50 μ lを腎動脈から急速投与後、静脈流出液並びに尿を経時的に採取、また実験終了直後に腎臓を摘出し、重量測定後ホモジナイズし、薬物濃度を測定した。PAHは血球に移行しないことから血漿中濃度をそのまま解析に用いた。また蛋白結合率は限外濾過法により測定した13%を用いた。有機アニオン輸送系阻害剤プロベネシドの影響は灌流液中に一定濃度添加しておく定常状態(Steady-state condition)実験でその影響を検討した。

阻害実験：種々の阻害剤のジゴキシン分泌に対する影響は阻害剤を一定濃度添加した灌流液をジゴキシン投与前から灌流させておく定常状態(Steady-state condition)実験で行なった。またこのとき投与液にも同濃度となるよう阻害剤を加えた。第2節、第3節でのキニジン、ベラパミル、ピンブラスチンの影響は、それらを灌流液には加えず、投与液にのみ加え、ジゴキシンと共に投与する同時投与(Bolus condition)実験でも検討した。

定量法：アルブミンは、エバンスブルーを波長610 nmの吸光度で、イヌリン、ジゴキシン、PAHは液体シンチレーション法にて 3 H)、 14 C)を

同時計測し、それぞれ静脈流出液、尿への全回収量の比として表した。
実験終了後の腎臓組織中薬物量は全回収量の1%以下であったので無視した。糸球体濾過速度は、血中および尿中のクレアチニン濃度をalkaline picrate法(73)で定量し、クレアチニンクリアランスとして求めた。 Na^+ 濃度はイオン選択性電極 (HORIBA, pNa glass electrode) を用い、グルコース濃度はo-toluidine法 (グルコーステストワコー; 和光純薬工業) を用いてそれぞれ定量した。

第2章 経細胞輸送評価系の確立とジゴキシン輸送機構の解明

試薬: [^3H]標識したジゴキシン(677.1 GBq/mmol)、コルチゾール(3256 GBq/mmol)、アルドステロン(3104 GBq/mmol)、デキサメサゾン(1480 GBq/mmol)、プロゲステロン(3460 GBq/mmol)、テストステロン(3223 GBq/mmol)、エストラジオール(1680 GBq/mmol)、コルチコステロン(3256 GBq/mmol)、および[^{14}C]標識したデオキシコルチコステロン(2.2 GBq/mmol)、イヌリン(0.38 GBq/g)はNew England Nuclear (Boston, MA) より購入した。[^3H]標識ビンブラスチン(592 GBq/mmol)、[^3H]標識イヌリン(31.6 GBq/g)はAmersham Corporation (Buckinghamshire, UK) より購入した。コルヒチンはナカライテスクより購入した。抗P-糖蛋白質モノクローナル抗体C219はCentocorから購入し、MRK16は鶴尾 隆教授 (東大・薬) から提供を受けた。2'-デオキシコフオルマイシン、9- β -D-キシロフラノシルアデニン(National Cancer Institute(Bethesda, MD))から得た。他の試薬は市販品特級を用いた。

第1節 MDR1 cDNAの培養腎上皮細胞LLC-PK₁への導入

細胞: プタ腎由来培養腎上皮細胞LLC-PK₁ (American Type Culture Collection, ATCC CRL-1392)は10 %牛胎児血清(Microbiological Associates, Rockville, MD)を含むmedium 199(Flow Laboratories, Bethesda, MD)で、5% CO_2 -95% air、37°Cの環境下、 CO_2 インキュベーター内で培養した。4-5日ごとに0.05%トリプシン、0.02% EDTA(GIBCO, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY)で細胞を剥離し継代した。LLC-GA5-COL150、LLC-GA5-COL300細胞は、培養液中にコルヒチンをそれぞれ150、300 ng/mlを添加し、7日ごとに継代した。

遺伝子導入: プラスミドpSKGA(Fig. 36)は共同研究者の植田らにより作成されたものであり、ヒト正常副腎より単離されたMDR1 cDNAが挿入されている(47)。このプラスミドをリン酸カルシウム沈澱法により LLC-PK₁細胞に導入した(48)。即ち、24時間前にconfluent の10%の密度で播種し、3時間前に培養液を交換した。 CaPO_4 -DNA共沈物を細胞培養液上清に滴下し、15時間後培養液を交換した。さらに、48時間後4-5枚の培養皿に分け、4 μM 9- β -D-キシロフラノシルアデニン(Xyl-A)、10nM 2'-デオキシコフオルマイシン (dCF) 存在下2週間培養した。pSKGAは、アデノシンデアミナーゼ(ADA)遺伝子を併せ持つことから、これを発現マーカーとした(53)。即ちADAにより無毒化され、細胞毒性を有するXyl-Aに耐性を持つクローンを選別した。dCFはADAの阻害剤であり、遺伝子増幅を促進させるために用いた。その結果、Xyl-Aに耐性を示す5クローンが得られた。次にSouthern blottingにより遺伝子導入の有無を調べたところ、LLC-GA5ではプラスミド由来DNAが染色体中に挿入され

ていることが明らかとなり、このクローンをコルヒチン濃度を段階的に(20, 40, 80, 150, 300 ng/ml)上昇させて培養した。そして、コルヒチン150, 300 ng/mlに耐性を示すLLC-GA5-COL150、LLC-GA5-COL300細胞を得た。

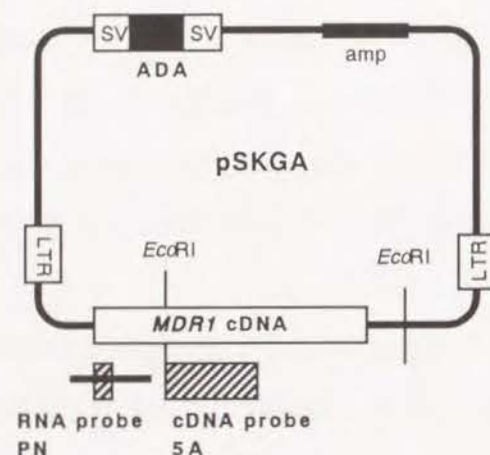


Fig. 36.
Scheme of pSKGA.

Southern blotting : 野生株並びに遺伝子導入株から抽出したDNAをEcoRIで消化し、5 μ gを0.8 %アガロース上で電気泳動し、ニトロセルロース膜上にブロッティングした。ヒトのMDR1 geneに対応する 32 P]標識cDNA probe 5A(75)をハイブリダイズさせた。

RNase protection assay : 野生株、遺伝子導入株並びにpositive controlとしてヒト肝癌HepG2細胞から抽出した全RNA、negative controlとしてtRNA、それぞれ10 μ gをMDR1 geneの最初のエクソン、イントロンから転写したPN probeとハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは、

80%フォルマミド、0.4 M NaCl、40 mM

piperazine-N,N'-bis(2-ethansulfonic acid)、1 mM EDTA緩衝液中45°C、14時間行なった。このプローブを49 μ gのRNase A、28 units/mlのRNase T1で30°C、1時間消化した。次にハイブリダイゼーションにより保護されたプローブを、6あるいは8%ポリアクリルアミド・7 Mウレアゲルにて検出した。PN probeはMDR1 geneの最初のエクソン、最初のイントロンの一部を含んでいること、またpSKGAに挿入されたMDR1 cDNAの5'-endが主要な転写開始部位であることから、最初のエクソンの134塩基がRNaseの消化を免れる(76)。

Western blotting : 野生株、遺伝子導入株を等張緩衝液中でnitrogen cavitation法で破壊し、ショ糖密度勾配遠心で膜蛋白を得た(77)。膜蛋白20 μ gを7%ゲル上でSDS-PAGEにて分離し、ニトロセルロース膜上にブロッティング、モノクローナル抗体C219(Centocor)と反応させた後、Amersham社のenhanced chemiluminescence法により検出した。

免疫染色 : 細胞を4%パラフォルムアルデヒドで15分固定した後、3%BSA PBS溶液でインキュベーションした。モノクローナル抗体MRK16を10 μ g/mlを含むTris-buffered saline(TBS)で15分反応させた。TBSで洗浄後、biotinylated rabbit anti-mouse IgG、alkaline phosphate-conjugated streptavidin (DAKO Corporation) と共にインキュベーション後、フクシン基質システム (DAKO Corporation) で染色した。

電子顕微鏡写真：単層培養した細胞を4%パラフォルムアルデヒドで固定し、0.2%BSA PBS溶液で洗浄後培養皿から剥離した。浮遊単層細胞をMRK16(10 μ g/ml)－抗マウスIgG-gold(10 nm)抱合体と反応させた。その後グルタルアルデヒドと四酸化オスミウムで固定し、1%低融点アガロースに包埋し200 nm切片を作成、100 kVでHitachi H-7100 electron microscopeで解析した。

経細胞輸送実験：野生株並びに遺伝子導入株をポリカーボネート膜TRANSWELL™(Costar, No.3414)上に 4×10^5 、 5×10^5 cells/cm²で播種した。培養液は側底膜側に2.6 ml、頂側膜側に1.5 mlを添加し、遺伝子導入株には、コルヒチン150 ng/mlを両側に加え、5%CO₂-95%air、37°C、CO₂インキュベーター内で3日間培養した。遺伝子導入株では、実験開始6時間前にコルヒチン除去のため新鮮培養液に交換した。³H]標識したビンブラスチン(12.5nM, 9.25 kBq/ml)を含む培養液を側底膜側あるいは頂側膜側に2 ml、反対側には基質を含まない培養液を2 ml添加した。1、2、3時間めに反対側の培養液を25 μ lずつ採取することにより経細胞輸送量を測定した。輸送量は透過薬物量を蛋白量で補正して表した。また、同時に¹⁴C]標識したイヌリン(3.3 μ g/ml, 1.25 kBq/ml)を添加しておき、細胞間隙の漏れをモニターした。実験終了直後に、氷冷緩衝液で細胞表面を洗浄し、0.3 N NaOH 1 mlで細胞を溶解し、細胞内残存量、タンパク量を測定した。経細胞輸送量、細胞内残存量は液体シンチレーション法で、タンパク量はBio-Rad Protein Assay Kitにて定量した。

第2節 P-糖蛋白質を介するステロイドホルモンの輸送

ステロイドホルモンの経細胞輸送実験：第1節に準じ、³H]標識したコルチゾール(11nM, 37 kBq/ml)、アルドステロン(12nM, 37 kBq/ml)、デキサメサゾン(25nM, 37 kBq/ml)、プロゲステロン(11nM, 37 kBq/ml)、テストステロン(11nM, 37 kBq/ml)、エストラジオール(22nM, 37 kBq/ml)、コルチコステロン(11.4nM, 37 kBq/ml)、¹⁴C]標識したデオキシコルチコステロン(1.72 μ M, 3.7 kBq/ml)を用いて野生株並びに遺伝子導入株で比較し、輸送される基質かどうかを検討した。細胞間隙の漏れは³H]標識基質の場合、¹⁴C]標識イヌリン(3.3 μ g/ml, 1.25 kBq/ml)を、¹⁴C]標識デオキシコルチコステロンの場合、³H]標識イヌリン(0.59 μ g/ml, 18.5 kBq/ml)でモニターした。輸送量は透過薬物量を添加薬物量に対する百分率として表した。ベラパミルの影響については、1時間前から両側に添加しておき、実験終了まで20 μ Mの濃度で共存させて、その効果を検討した。

第3節 経細胞輸送評価系によるジゴキシン輸送

経細胞輸送実験：基質は、ビンブラスチンの代わりに³H]標識したジゴキシン(100nM, 74kBq/ml)を用い、第1節に準じて行なった。阻害剤の影響はビンブラスチン、キニジン、ベラパミルそれぞれ20 μ Mを1時間前から実験終了まで両側に添加し、その効果を検討した。

第4節 細胞からのジゴキシン排出

野生株および遺伝子導入株を経細胞輸送実験と同様にTRANSWELL™上に播種し、その48時間後、³H]標識した100 nM ジゴキシンを含み、コルヒチンを含まない培養液を側底膜側に2.2 ml、頂側膜側に1 ml添加し、ジゴキシンを細胞内に取り込ませた。24時間後氷冷培養液で2回洗浄し、

1.5 ml新鮮培養液に両側とも置換し、1、2、3時間めに頂側膜側、側底膜側の培養液を50 μ lずつ採取することにより、細胞からの排出量を測定した。3時間めの採取が終了した後、氷冷緩衝液で洗浄後、0.3 N NaOH 1 mlで細胞を溶かし、細胞内残存量とタンパク量を第1節と同様に測定した。排出量は、培養液中回収量と細胞内残存量の総和を時間0における細胞内残存量（24時間での全取り込み量）とし、それに対する百分率として表した。キニジンの影響は、排出時の培養液のみに50、100 μ Mの濃度で添加し、その効果を検討した。取り込ませるときに共存させないのは、排出実験を行なう前の細胞への取り込み量を一定にさせるためである。

第3章 ジゴキシン腎排泄に対する相互作用予測システムの構築

試薬： ^3H 標識ジゴキシン(677.1 GBq/mmol)、 ^{14}C 標識インスリン(0.36 GBq/g)はNew England Nuclear (Boston, MA)より購入した。 ^3H 標識アジドピン(1850 GBq/mmol)、 ^3H 標識シクロスポリンA (433 GBq/mmol)はAmersham Corporation (Buckinghamshire, UK)より購入した。スピロノラクトンはナカライテスクから購入した。非標識シクロスポリンAはサンド薬品から提供を受けた。他の試薬は市販品特級を用いた。

第1節 ジゴキシンスピロノラクトン相互作用機構

アジドピン光アフィニティラベリング：Western blottingと同様に野生株、遺伝子導入株から膜蛋白画分を分取し、その蛋白質40 μ gと0.2 μ M ^3H アジドピン (0.37 MBq/ml)をスピロノラクトンあるいはベラパミル存

在下、非存在下それぞれ室温で20分間インキュベーションした。次に氷上で紫外線ランプ(Ultra-Violet Products, Black Ray Type XX-15L)で30分照射した。7%ゲル上でSDS-PAGEによりラベル化された蛋白質を分離し、10%酢酸、30%メタノールで固定後、Autoradiography用増感剤(EN 3 HANCE, New England Nuclear)を用いて解析した。

経細胞輸送実験：第2章に準じ、遺伝子導入株を用い検討した。基質は、 ^3H 標識したビンブラスチン(12.5nM, 16.9kBq/ml)並びにジゴキシン(100nM, 37 kBq/ml)を用いた。スピロノラクトンはジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した後、培養液で100倍希釈後、20、50 μ Mの濃度で1時間前から実験終了まで両側に添加しておき、その効果を検討した。同濃度(1%)のDMSOのみでは経細胞輸送に影響がないことを確認した。

排出実験：第2章第4節に準じて行なった。スピロノラクトンはDMSOに溶解し、排出時の培養液にのみ50、100 μ Mの濃度で添加し、その効果を検討した。なお、DMSO自身はジゴキシン輸送に影響しないことを予備実験で確認した。

摘出灌流腎：第1章に準じ、スピロノラクトンのジゴキシン分泌に対する影響を検討した。スピロノラクトンはDMSOに溶解した後、灌流液に20、50 μ Mとなるよう添加し、その影響を検討した。灌流液中DMSO濃度は0.83%であり、この濃度ではジゴキシン分泌に影響がないことを確認した。

第2節 ジゴキシンスクロスポリンA相互作用機構

経細胞輸送実験：野生株並びに遺伝子導入株を用い、第2章に準じて経細胞輸送実験を行なった。基質は $[^3\text{H}]$ 標識したジゴキシン(55nM, 37 kBq/ml)あるいはシクロスポリンA(85.5nM, 37 kBq/ml)を用いた。ジゴキシンに対するシクロスポリンAの影響はシクロスポリンAをエタノール溶解後、培養液で100倍希釈後、5、10 μM の濃度で1時間前から実験終了まで両側に添加しておき、その効果を検討した。エタノール(1%)自身は経細胞輸送に影響しないことを確認した。

摘出灌流腎：第1章に準じて行なった。シクロスポリンAはエタノールに溶解後、灌流液に120倍希釈で1 μM 、5 μM の濃度で添加しておき、ジゴキシン分泌に対する影響を検討した。エタノール(0.83%)自身はジゴキシン腎挙動に影響がないことを確認した。

引用文献

1. Hoffman, B.F. and Bigger, J.T., Jr.: Digitalis and allied cardiac glycosides. *In* The Pharmacological Basis of Therapeutics, ed. by A. G. Gilman, L. S. Goodman, T. W. Rall and F. Murad, pp. 716-747, Macmillan Publishing Co., New York, NY., 1985.
2. Reuning, R. H. and Geraets, D. R.: Digoxin. *In* Applied Pharmacokinetics, ed. by W. E. Evans, J. J. Schentag and W. J. Jusko, pp.570-623, Applied Therapeutics, Inc., spokane, WA., 1986.
3. Smith, T. W. and Hager, E.: Digoxin intoxication: the relationship of clinical presentation to serum digoxin concentration. *J. Clin. Invest.* 49: 2377-2386, 1970.
4. Steiness, E.: Renal tubular secretion of digoxin. *Circulation* 50: 103-107, 1974.
5. Koup, J. R., Greenblatt, D. J., Jusko, W. J., Smith, T. W. and Koch-Weser, J.: Pharmacokinetics of digoxin in normal subjects after intravenous bolus and infusion doses. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 3: 181-192, 1975.
6. Ochs, H. R., Greenblatt D. J., and Boden, G. Single- and multi-dose kinetics of intravenous digoxin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 28: 340-345, 1980.
7. Koren, G.: Clinical pharmacokinetics significance of the renal tubular secretion of digoxin. *Clin. Pharmacokinet.* 13: 334-343, 1987.
8. Rodin, S. M. and Johnson, B. F.: Pharmacokinetic Interactions with

Digoxin. *Clin. Pharmacokinet.* 15: 227, 1988.

9. Hori, R., Tanigawara, Y., Saito, Y., Hayashi, Y., Aiba, T., Okumura, K. and Kamiya, A.: Moment analysis of drug disposition in kidney: Transcellular transport kinetics of *p*-aminohippurate in the isolated perfused rat kidney. *J. Pharm. Sci.* 77: 471-476, 1988.
10. Kamiya, A., Tanigawara, Y., Saito, Y., Hayashi, Y., Aiba, T., Inui, K. and Hori, R.: Moment analysis of drug disposition in kidney II: Urine pH-dependent tubular secretion of tetraethylammonium in the isolated perfused rat kidney. *J. Pharm. Sci.* 79: 692-697, 1990.
11. Tanigawara, Y., Saito, Y., Aiba, T., Ohoka, K., Kamiya, A. and Hori, R.: Moment analysis of drug disposition in kidney III: Transport of *p*-aminohippurate and tetraethylammonium in the perfused kidney isolated from uranyl nitrate-induced acute renal failure rats. *J. Pharm. Sci.* 79: 249-256, 1990.
12. Saito, Y., Tanigawara, Y., Okamura, N., Shimizu, H., Kamiya, A. and Hori, R.: Moment analysis of drug disposition in kidney: Role of basolateral membrane transport in renal transepithelial transport of *p*-aminohippurate. *J. Pharm. Pharmacol.* 43: 311-316, 1991.
13. Aronson, J. K. and Grahame-Smith, D. G.: Monitoring digoxin therapy: II. Determinants of the apparent volume of distribution. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 4: 223-227, 1977.
14. Weiner, I. M.: Transport of weak acids and bases. In *Renal Physiology*. ed. by J. Orloff, R. W. Berliner, American Physiological

Society, Washington, DC, pp. 521-554, 1973.

15. McKinney, T. D.: Renal transport of organic anions and cations. In *Diseases of the Kidney*. ed. by R. W. Schrier, C. W. Gottschalk, Little Brown and Company, Boston/Tronto pp. 285-307, 1988.
16. Hori, R., Takano, M., Okano, T., Kitazawa, S. and Inui, K.: Mechanism of *p*-aminohippurate transport by brush-border and basolateral membrane vesicles isolated from rat renal cortex. *Biochim. Biophys. Acta* 692: 97-100, 1982.
17. Hori, R., Maegawa, H., Kato, M., Katsura, T. and Inui, K.: Inhibitory effect of diethylpyrocarbonate on the H⁺/organic cation antiport system in rat renal brush-border membranes. *J. Biol. Chem.* 264: 12232-12237, 1987.
18. Takano, M., Kato, M., Takayama, A., Yasuhara, M., Inui, K., and Hori, R.: Transport of procainamide in a kidney epithelial cell line LLC-PK₁. *Biochim. Biophys. Acta* 1108: 133-139, 1992.
19. Koren, G., Klein, J., Giesbrecht, E., Dayan, R. B., Soldin, S., Sellers, E., MacLeod, S. and Silverman, M.: Effects of quinidine on the renal tubular and biliary transport of digoxin: In vivo and in vitro studies in the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247: 1193-1198, 1988.
20. Wernke, M. J. and Cacini, W.: Concentrative uptake of digoxin by slice of chicken renal cortex. *Biochem. Pharmacol.* 39: 655-659, 1990.
21. Okudaira, K., Sawada, Y., Sugiyama, Y., Iga, T. and Hanano, M.: Effects of basic drugs on the hepatic transport of cardiac glycosides in rats. *Biochem. Pharmacol.* 37: 2949-2955, 1988.

22. O'Brien, M. S., Salamone, L. F. and Gibson, T. P.: Effect of spironolactone on the renal clearance of digoxin in dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234: 190-194, 1985.
23. Ito, S., Koren, G. and Harper, P. A.: Handling of digoxin and ouabain by renal tubular cells (LLC-PK1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262: 109-113, 1992.
24. Ejvinsson, G.: Effect of quinidine on plasma concentrations of digoxin. *Br. J. Pharmacol.* 4: 279-280, 1978.
25. Leahey, E. B., Jr., Reiffel, J. A., Drusin, R.E., Heissenbuttel, R. H., Lovejoy, W.R. and Bigger, J.T., Jr.: Intereaction between quinidine and digoxin. *J. Am. Med. Assoc.* 240: 533-534, 1978.
26. Leahey, E. B., Jr., Reiffel, J. A., Giardina, E.V. and Bigger, J.T., Jr.: The effect of quinidine and other oral antiarrhythmic drugs on serum digoxin. A prospective study. *Ann. Intern. Med.* 92: 605-608, 1980.
27. Doering, W.: Quinidine-digoxin interaction. Pharmacokinetics, underlying mechanism and clinical implications. *N. Engl. J. Med.* 301: 400-404, 1979.
28. Hager, W. D., Fenster, P., Mayersohn, M., Perrier, M., Graves, P., Marcus, F. I. and Goldman, S.: Digoxin-quinidine interaction. Pharmacokinetics evaluation. *N. Engl. J. Med.* 300: 1238-1241, 1979.
29. Leahey, E. B., Jr., Bigger, J.T., Jr., Butler, V. P., Jr., Reiffel, J. A., O'Connell, G. C., Scaffidi, L. E. and Rottman, J. N.: Quinidine-digoxin interaction: Time course and pharmacokinetics. *Am. J. Cardiol.* 48: 1141-1146, 1981.
30. Pedersen, K. E., Hastrup, J. and Hvidt, S.: The effect of quinidine on digoxin kinetics in cardiac patients. *Acta Med. Scand.* 207: 291-295, 1980.
31. Angelin, B., Arvidsson, A., Dahlqvist, R., Hedman, A. and Schenck-Gustafsson, K.: Quinidine reduces biliary clearance of digoxin in man. *Eur. J. Clin. Invest.* 17: 262-265, 1987.
32. Hedman, A., Angelin, B., Arvidsson, A., Dahlqvist, R. and Nilsson, B.: Interactions in the renal and biliary elimination of digoxin: Stereoselective difference between quinine and quinidine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 47: 20-26, 1990.
33. Pedersen, K. E., Dorph-Pedersen, A., Hvidt, S., Klitgaard, N. A. and Nielsen-Kudsk, F.: Digoxin-verapamil interaction study. *Clin. Pharmacol. Ther.* 30: 311-316, 1981.
34. Pedersen, K. E., Dorph-Pedersen, A., Hvidt, S., Klitgaard, N. A. and Pedersen, K. K.: The long term effect of verapamil on plasma digoxin concentration and renal digoxin clearance in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 22: 123-127, 1982.
35. Klein, H. O., Lang, R., Weiss, E., Segni, E. D., Libhaber, C., Guerreiro, J. and Kaplinsky, E.: The influence of verapamil on serum digoxin concentration. *Circulation* 65: 998-1003, 1982.
36. Goresky, C. A. and Bach, G. B.: Membrane transport and the hepatic circulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 170: 18-45, 1970.
37. Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I.

- and Willingham, M. C.: Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7735-7738, 1987.
38. Tsuruo, T., Iida, H., Kitatani, Y., Yokota, K., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.: Effect of quinidine and related compounds on cytotoxicity and cellular accumulation of vincristine and ariamycin in drug-resistant tumor cells. *Cancer Res.* 44: 4303-4307, 1984.
 39. Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.: Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro though enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* 41: 1967-1972, 1981.
 40. Kane, S. E., Pastan, I. and Gottesman, M. M.: Genetic basis of multidrug resistance of tumor cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* 22: 593-618, 1989.
 41. Gottesman, M. M. and Pastan, I.: The multidrug transporter, a double-edged sword. *J. Biol. Chem.* 263: 12163-12166, 1988.
 42. Endicott, J. A. and Ling, V.: The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 137-171, 1989.
 43. Pearce, H. L., Safa, A. R., Bach, N. J., Winter, M. A., Cirtain, M. C. and Beck, W. T.: Essential features of the P-glycoprotein pharmacophore as defined by a series of reserpine analogs that modulated multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5128-5132, 1989.
 44. Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I. and Willingham, M. C.: Immunocytochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: Evidence for localization in brain capillaries and cross reactivity of one antibody with a muscle protein. *J. Histochem. Cytochem.* 37: 159-164, 1989.
 45. Sugawara, I., Nakahama, M., Hamada, H., Tsuruo, T. and Mori, S.: Apparent stronger expression in the human adrenal cortex than in the human adrenal meddula of Mr 170,000-180,000 P-glycoprotein. *Cancer Res.* 48: 4611-4614, 1988.
 46. Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J. L., Melamed, M. R. and Bertino, J. R.: Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 695-698, 1989.
 47. Kioka, N., Tsubota, J., Kakehi, Y., Komano, T., Gottesman, M. M., Pastan, I. and Ueda, K.: P-glycoprotein gene (*MDR1*) cDNA from human adrenal: Normal P-glycoprotein carries Gly¹⁸⁵ with and altered pattern of multidrug resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 224-231, 1989.
 48. Graham, F. L. and van der Eb, A. J.: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456-467, 1973.
 49. Misfeldt, D. S. and Sanders, M. J.: Transepithelial transport in cell

- culture: D-glucose transport by a pig kidney cell line (LLC-PK₁). *J. Membr. Biol.* 59: 13-18, 1981.
50. Fauth, C., Rossier, B. and Roch-Ramel, F.: Transport of tetraethylammonium by a kidney epithelial cell line (LLC-PK₁). *Am. J. Physiol.* 254: F351-F357, 1988.
 51. Takayama, A., Okazaki, Y., Fukuda, K., Takano, M., Inui, K. and Hori, R.: Transport of cyclosporin A in kidney epithelial cell line (LLC-PK₁). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 200-204, 1991.
 52. Saito, H., Yamamoto, M., Inui, K. and Hori, R.: Transcellular transport of organic cation across monolayers of kidney epithelial cell line LLC-PK₁. *Am. J. Physiol.* 262: C59-C66, 1992.
 53. Kaufman, R. J., Murtha, P., Ingolia, D. E., Yeung, C.-Y. and Kellems, R. E.: Selection and amplification of heterologous genes encoding adenosine deaminase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3136-3140, 1986.
 54. Horio, M., Chin K.-V., Currier, S. J., Goldenberg, S., Williams, C., Pastan, I., Gottesman, M. M. and Handler, J.: Transepithelial transport of drugs by the multidrug transporter in cultured Madin-Darby Canine kidney cell epithelia. *J. Biol. Chem.* 264: 14880-14884, 1989.
 55. Arceci, R. J., Croop, J. M., Horwitz, S. B. and Housman, D.: The gene encoding multidrug resistance is induced and expressed at high levels during pregnancy in the secretory epithelium of the uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4350-4354, 1988.
 56. Yang, C.-P. H., Cohen, D., Greenberger, L. M., Hsu, S. I.-H. and Horwitz, S. B.: Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells and in the endometrium of gravid cterus. *J. Biol. Chem.* 265: 10282-10288, 1990.
 57. Yang, C.-P. H., DePinho, S. G., Greenberger, L. M., Arceci, R. J. and Horwitz, S. B.: Differential transport properties of two *mdr* gene products are distinguished by progesterone. *J. Biol. Chem.* 264: 782-788, 1989.
 58. Kurihara, A., Suzuki, H., Sawada, Y., Sugiyama, Y., Iga, T. and Hanano, M.: Transport of digoxin into brain microvessels and choroid plexuses isolated from guinea pig. *J. Pharm. Sci.* 77: 347-352, 1988.
 59. Ochs, H. R., Greenblatt, D. J., Bodem, G. and Smith, T. W.: Spironolactone. *Am. Heart J.* 96: 389-400, 1978.
 60. Skluth, H. A. and Gums, J. G.: Spironolactone: A re-examination. *Drug Intell. Clin. Pharm.* 24: 52-59, 1990.
 61. Waldorff, S., Andersen, J. D., Heeboll-Nielsen, N., Nielsen, O. G., Moltke, E., Sorensen, U. and Steiness, E.: Spironolactone-induced changes in digoxin kinetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 24: 162-167, 1978.
 62. Waldorff, S., Hansen, P. B., Egeblad, H., Berning, J., Buch, J., Kjærgård, H. and Steiness, E.: Interactions between digoxin and potassium-sparing diuretics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 33: 418-423, 1983.

63. Fenster, P. E., Hager, W. D. and Goodman, M. M.: Digoxin-quinidine-spironolactone interaction. *Clin. Pharmacol. Ther.* 36: 70-73, 1984.
64. Safa, A. R., Glover, C. J., Sewell, J. L., Meyers, M. B., Biedler, J. L. and Felsted, R. L.: Identification of the multidrug resistance-related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. *J. Biol. Chem.* 262: 7884-7888, 1987.
65. Greenberger, L. M., Yang, C.-P. H., Gindin, E. and Horwitz, B.: Photoaffinity probes for the α 1-adrenergic receptor and the calcium channel bind to a common domain in P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 265: 4394-4401, 1990.
66. Overdiek, H. W. P. M., Hermens, W. A. J. J. and Mercus, F. W. H. M.: New insights into the pharmacokinetics of spironolactone. *Clin. Pharmacol. Ther.* 38: 469-474, 1985.
67. Twentyman, P. R.: Modification of cytotoxic drug resistance by non-immunosuppressive cyclosporins. *Br. J. Cancer* 57: 254-258, 1988.
68. Twentyman, P. R.: Cyclosporins as drug resistance modifiers. *Biochem. Pharmacol.* 43: 109-117, 1992.
69. Foxwell, B. M. J., Mackie, A., Ling, V. and Ryffel, B.: Identification of the multidrug resistance-related P-glycoprotein as a cyclosporine binding protein. *Mol. Pharmacol.* 36: 543-546, 1989.
70. Ptachcinski, R. J., Venkataramanan, R. and Burckart, G. J.: Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. *Clin. Pharmacokinet.* 11: 107-132, 1986.
71. Lindholm, A.: Factors influencing the pharmacokinetics of cyclosporine in man. *Ther. Drug Monit.* 13: 465-477, 1991.
72. Dorian, P., Strauss, M., Cardella, C., David, T., East, S. and Ogilvie, R.: Digoxin-cyclosporine interaction: Severe digitalis toxicity after cyclosporine treatment. *Clin. Invest. Med.* 11: 108-112, 1988.
73. Nishiitsutsuji-Uwo, J. M., Ross, B. D. and Krebs, H. A.: Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. *Biochem. J.* 103: 852-862, 1967.
74. Folin, O. and Wu, H.: A system of blood analysis. *J. Biol. Chem.* 38: 81-110, 1919.
75. Ueda, K., Clark, D. P., Chen, C.-j., Roninson, I. B., Gottesman, M. M. and Pastan, I.: The human multidrug resistance (mdr1) gene. *J. Biol. Chem.* 262: 505-508, 1987.
76. Ueda, K., Yamano, Y., Kioka, N., Kakehi, Y., Yoshida, O., Gottesman, M. M., Pastan, I., Komano, T.: Detection of multidrug resistance (MDR1) gene RNA expression assay in human tumors by a sensitive ribonuclease protection assay. *Jpn. J. Cancer Res.* 80: 1127-1132, 1989.
77. Cornwell, M. M., Gottesman, M. M. and Pastan, I.: Increased vinblastine binding to membrane vesicles from multidrug-resistant KB cells. *J. Biol. Chem.* 261: 7921-7928, 1986.